

Universitätsklinikum des Saarlandes  
Institut für Klinisch – Experimentelle Chirurgie  
der Universität des Saarlandes

Direktor: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Etablierung und Anwendung eines neuen Modells zur quantitativen in vivo mikroskopischen Analyse der Thrombusentstehung und vaskulären Rekanalisation am Ohr der haarlosen Maus

*Development and Application of a New Model for Quantitative in Vivo Microscopic Analysis of Thrombus Formation and Vascular Recanalisation in the Ear of the Hairless (hr/hr) Mouse*

Inauguraldissertation  
zur  
Erlangung des medizinischen Doktorgrades  
der  
Medizinischen Fakultät  
der  
Universität des Saarlandes

vorgelegt von  
Frank Rösken  
aus Augsburg

Dekan: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

Berichterstatter: Prof. Dr. med. Michael D. Menger

## Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	5
Summary	7
Einleitung	9
Ziel der Studie	12
Material und Methodik	13
Homozygote Haarlose Maus (hr/hr)	13
Die Haarlose Maus als Versuchstier	13
Anatomie des Ohres der Haarlosen Maus	15
Induktion des Thrombus	19
Intravitale Fluoreszenzmikroskopie	22
Mikrozirkulationsanalyse	25
Elektronenmikroskopie	29
Untersuchte Wirkstoffe	30
Heparin	30
Hirudin	31
Versuchsdesign	32
Statistische Auswertung	34
Ergebnisse	35
Thrombusbildung und vaskuläre Rekanalisation	35
Mikrozirkulation	37
Inflammatorische Antwort	39
Ultrastrukturelle Auswertung	41
Wirkung von Heparin	44
Wirkung von r-Hirudin (HBW 023)	46
Thrombusbildung und vaskuläre Rekanalisation	46

Mikrozirkulation	50
Inflammatorische Antwort	52
Diskussion	54
Etablierung und Validierung des Modells	54
Wirkung von r-Hirudin (HBW 023)	59
Literaturverzeichnis	63
Danksagung	80
Publikationen	81
Lebenslauf	91

## Zusammenfassung

Veränderungen der Rheologie und der Hämodynamik des Blutes, wie auch die Störung spezifischer Interaktionsmechanismen von Blut- und Endothelzellen sind maßgeblich bei der Entstehung von Gefäßthromben beteiligt. In der vorliegenden Arbeit stellen wir ein tierexperimentelles Modell vor, welches eine quantitative in vivo mikroskopische Beurteilung der genannten pathophysiologischen Faktoren über den kompletten Zeitraum der Thrombusbildung und einer möglichen Rekanalisation erlaubt. Das Modell erfordert keine chirurgische Präparation und bietet die Möglichkeit der wiederholten Beobachtung identischer Mikrogefäße über einen Zeitraum von Tagen oder Monaten.

Die Auslösung der Gefäßthrombose an Arteriolen und Venolen am Ohr von zehn anästhesierten haarlosen Mäusen (hr/hr) erfolgte mittels einer photochemischen Reaktion durch fokussierte Lichtexposition nach intravenöser Gabe der photoreaktiven Substanz FITC-Dextran. In Venolen führte dieses Vorgehen zu einer raschen Thrombusbildung. Bereits nach  $59 \pm 2$  s zeigten sich erste Ablagerungen an der Gefäßwand (first platelet deposition=FPD), gefolgt von dem völligen Verschluss des Lumens (complete vessel occlusion=CVO) nach  $449 \pm 78$  s. Nach 24 Stunden war es in 75% der thrombosierte Venolen zu einer spontanen Rekanalisation gekommen. Eine deutlich erhöhte Rate der Zell – Zell – Interaktionen über einen Zeitraum von 7 Tagen zwischen Leukozyten und Endothelzellen in diesen Venolen belegt jedoch einen anhaltenden Schaden oder zumindest eine erhöhte Aktivität der endothelialen Zellen. In Arteriolen provozierte die photochemische Thrombusinduktion ein gehäuftes Auftreten von Vasomotion. Die Ausbildung eines Gefäßverschlusses war hier jedoch im Vergleich zu Venolen signifikant verzögert ( $p < 0.05$ ). Erste Ablagerungen an der Gefäßwand ließen sich erst nach  $139 \pm 13$  s nachweisen. Der komplette Verschluss konnte nach  $1204 \pm 230$  s beobachtet werden. Eine spontane Rekanalisation nach 24 Stunden konnte nur in einer Arteriole nachgewiesen werden, in der sich aber keine nachweisbare Leukozyten – Endothelzell – Interaktion fand.

Die i.v. Applikation von Heparin (300U/kg Körpergewicht; n=6 Tiere) konnte sowohl im Bezug auf die Entstehung erster Thrombozytenadhäsionen an der Gefäßwand (FPD: Venolen  $190 \pm 14$  s, Arteriolen  $259 \pm 59$  s), als auch bei der Ausbildung der vollständigen Gefäßokklusion (CVO: Venolen  $1267 \pm 454$  s) die Thrombusentstehung in diesem Modell signifikant beeinflussen ( $p < 0.05$ ).

Nach erfolgter Etablierung und Validierung, anhand der Untersuchung der antithrombotischen Wirksamkeit von Heparin in unserem Modell, wurde mit Hilfe dieser experimentellen Versuchsanordnung eine erste Wirkstoffstudie durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung (n=16 Tiere in 2 Gruppen) war es in vivo die Wirkungsweise und Effektivität von rekombinantem Hirudin (r-Hirudin, HBW023), einem potenten direkten Thrombin-inhibitor, auf die Thrombosierung und Rekanalisation von Mikrogefäßen zu untersuchen. Die intravenöse Applikation von r-Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) führte in Arteriolen (FPD  $381 \pm 80$ s vs.  $137 \pm 25$ s,  $p < 0.05$ ; CVO  $925 \pm 78$ s vs.  $854 \pm 60$ s) wie Venolen (FPD  $173 \pm 11$ s vs.  $59 \pm 4$ s,  $p < 0.05$ ; CVO  $541 \pm 85$ s vs.  $344 \pm 43$ s,  $p < 0.05$ ) zu einer signifikant verzögerten Thrombusbildung im Vergleich zur mit Kochsalzlösung (NaCl 0,9% i.v.) behandelten Kontrollgruppe. Darüber hinaus löste die Gabe von r-Hirudin eine gehäufte Rekanalisation thrombosierter Mikrogefäße nach 24h aus (Arteriolen: 54% vs. 0%,  $p < 0.05$ ; Venolen: 77% vs. 53%). Mikrozirkulatorische Parameter, wie auch mögliche Leukozyten – Endothelzell – Interaktionen blieben davon unberührt.

Somit lässt sich als Resultat dieser Arbeit folgendes festhalten:

Das experimentelle in vivo Modell am Ohr der haarlosen Maus erlaubt auf einfache Weise ohne chirurgische Präparation die gezielte Beobachtung der Entstehung eines Gefäß-thrombus und eine mögliche Rekanalisation in Arteriolen und Venolen, insbesondere auch mit der Chance begleitender Analysen mikrozirkulatorischer Parameter und relevanter Leukozyten – Endothelzell - Interaktionen.

Die im Ergebnis mit vergleichbaren experimentellen Studien validen Ergebnisse der Untersuchung der antithrombotischen Wirksamkeit von Heparin belegen die Qualifikation des vorgestellten Modells für die Analyse neuer Wirkstoffe zur Thromboseprophylaxe und/oder -therapie.

Somit repräsentiert dieses tierexperimentelle Thrombosemodell ein interessantes Instrument für die Untersuchung von neuen Behandlungsstrategien zur Thromboseprophylaxe und Thrombolysen.

Unsere Ergebnisse der Untersuchung von r-Hirudin belegen die antithrombotische und auch thrombolytische Wirksamkeit dieser Substanz in Mikrogefäßen und weisen sie als nützliches Hilfsmittel im Bereich der Mikrochirurgie aus.

## Summary

The alteration of rheological blood properties as well as deterioration of vascular perfusion conditions and cell-cell interactions are major determinants of thrombus formation. Herein, we present an experimental model which allows for quantitative in vivo microscopic analysis of these determinants during both thrombus formation and vascular recanalisation. The model does not require surgical preparation procedures, and enables for repeated analysis of identical microvessels over time periods of days or month, respectively.

After i.v. administration of FITC-dextran thrombus formation was induced photochemically by light exposure to individual arterioles and venules of the ear of ten anaesthetized hairless mice (hr/hr). In venules, epi-illumination induced rapid thrombus formation with first platelet deposition (FPD) after  $59\pm 2$ s and complete vessel occlusion (CVO) within  $449\pm 78$ s. After a 24h time period, 75% of the thrombosed venules were found recanalised. Marked leukocyte-endothelial cell interaction in those venules indicated persistent endothelial cell activation and/or injury, even after an observation period of 7 days. In arterioles, epi-illumination provoked vasomotion, while thrombus formation was significantly ( $p<0.05$ ) delayed with first platelet deposition after  $139\pm 13$ s and complete vessel occlusion within  $1204\pm 230$ s. Strikingly, only one of the investigated arterioles was found recanalised after 24h, which, however, did not show leukocyte-endothelial cell interaction.

Heparin (300U/kg bw, i.v.,  $n=6$ ) effectively counteracted ( $p<0.05$ ) the process of thrombus formation in this model, including both first platelet deposition (venules:  $190\pm 14$ s, arterioles:  $259\pm 59$ s) and vessel occlusion (venules:  $1267\pm 454$ s).

After validation of the presented model we accomplished a first study using this new tool to evaluate in vivo the effect of recombinant hirudin (r-hirudin, HBW023), a potent thrombin inhibitor, on the process of microvascular thrombus formation and recanalization. Thrombosis was induced in distinct arterioles and venules of the ear of 16 hairless mice. r-hirudin (1mg/kg bw.) was administered intravenously directly before thrombus formation ( $n=8$ ); saline-treated animals served as controls ( $n=8$ ). Thrombus formation, vessel recanalization, microcirculatory parameters and leukocyte-endothelial-interactions were analyzed. Hirudin significantly delayed the process of thrombus formation compared with saline treated controls in both arterioles (FPD  $381\pm 80$ s vs.  $137\pm 25$ s,  $p<0.05$ ; CVO  $925\pm 78$ s

vs.  $854 \pm 60$ s) and venules (FPD  $173 \pm 11$ s vs.  $59 \pm 4$ s,  $p < 0.05$ ; CVO  $541 \pm 85$ s vs.  $344 \pm 43$ s,  $p < 0.05$ ). In addition, r-hirudin-treated animals showed an increased rate of vessel recanalization at 24 hours after thrombus induction (arterioles: 54% vs. 0%,  $p < 0.05$ ; venules: 77% vs. 53%), whereas microcirculatory parameters and leukocyte-endothelial cell-interactions were not affected.

We therefore conclude:

The model of the ear of the hairless mouse (hr/hr) allows for distinct in vivo analysis of arteriolar and venular thrombus formation and vessel recanalization as well as for accompanying evaluation of microcirculatory parameters and leukocyte-endothelial cell interactions.

The validation of the model by comparison with other experimental models for thrombus induction (effectiveness of heparin) indicated the qualification of our model.

Therefore, the introduced experimental set-up represents an interesting tool for the study of novel antithrombotic and thrombolytic strategies, respectively.

In addition, the results of the study of the antithrombotic effectiveness of recombinant hirudin on microvascular thrombus formation and recanalization indicate that r-hirudin not only counteracts the process of thrombus formation but also promotes vessel recanalization in microvessels, thus supporting its use in clinical microvascular surgery.



## Einführung

Trotz großer Fortschritte im Bereich der medizinischen Forschung ist die Gefäßthrombose, nach wie vor, ein häufiges und klinisch höchst relevantes Problem (HAINES et al., SPYROPOULOS). Längst zählt die Thrombose und ihre schwerste Komplikation die Lungenembolie, gerade in den hochentwickelten Industrienationen zu den Volkskrankheiten. Jährlich erkranken allein in Deutschland mehr als 80.000 Menschen an einer Gefäßthrombose, jeder fünfte der Erkrankten leidet lebenslang an den Folgen der häufig auftretenden narbigen Veränderungen der Gefäßwand und entwickelt dadurch ein postthrombotisches Syndrom. Die Inzidenz der Lungenembolie übertrifft diese Zahl noch. So erleiden ca. 100.000 Menschen jährlich eine Lungenembolie, ca. 30.000 versterben daran. Damit ist die Letalität dieses Krankheitsbildes viermal höher als die Zahl der jährlichen Verkehrstoten in der Bundesrepublik (MÜLLER-NORDHORN et al.).

Allerdings ist nicht nur die Thrombosierung großer Strombahnen, sondern ebenso die Problematik des Gefäßverschlusses nach gefäß- oder mikrochirurgischen Eingriffen, trotz modernster medizinischer Versorgung, ein nicht selten den Erfolg der Operation entscheidende Komplikation (PEDERSON).

Um die Bildung von Gefäßthromben, unabhängig ob sie im Rahmen einer systemischen Erkrankung oder als Komplikation nach einem (mikro-)chirurgischen Eingriff oder durch lange Immobilisation entstehen, erfolgreich zu verhindern bzw. neue Therapieansätze entwickeln zu können und auf ihre Wirksamkeit zu überprüfen, ist es unumgänglich, die exakten pathophysiologischen Vorgänge zu kennen und diese in vivo beurteilen zu können.

In der Vergangenheit sind eine Reihe von in vivo Modellen für die Untersuchung der Thromboseentstehung entwickelt worden (BODARY et al., DAVIDSON et al., HIRSCHBERG et al., STEPNIK et al., VAN DER GIESSEN et al.). Allerdings erlauben nur wenige dieser Modelle die direkte Analyse der intravaskulären Veränderungen im Moment der Thrombusentstehung (JOURDAN et al., SEIFFGE et al., UMEMURA et al.). Alle diese Modelle kommen nicht aus ohne teils aufwendige chirurgische Präparation. Daher ist stets das Risiko einer iatrogenen Beeinflussung des Versuchsablaufs durch traumabedingte Zellaktivierung gegeben, was zu einer ungewollten Veränderung der erzielten Ergebnisse führen kann.

Mit der hier vorliegenden Studie stellen wir ein Modell an der haarlosen Maus (hr/hr) vor, das keine chirurgische Präparation für die in vivo Untersuchung der Thromboseentstehung notwendig macht.

Darüber hinaus erlaubt es mittels Intravital-Mikroskopie die wiederholte Beurteilung der verschiedenen Phasen der Thrombusentstehung in Arteriolen als auch in Venolen. Hierbei lassen sich der Prozess der Thrombusbildung, der komplette vaskuläre Verschluss, die mögliche Rekanalisation des Gefäßlumens wie auch spezifische, mikrozirkulatorisch relevante Parameter über einen längeren Zeitraum beobachten und bestimmen. Diese umfassen Gefäßdurchmesser, Erythrozytengeschwindigkeit, Endothelpermeabilität, Vasomotion sowie die Leukozyten – Endothelzell Interaktion.

Die Möglichkeit der Analyse der Mikrozirkulation macht dieses Modell aber auch von besonderem Interesse für die Untersuchung neuer Therapieansätze zur Thromboseprophylaxe bei feinchirurgischen Eingriffen, wie sie im Bereich der Gefäß-, Herz- oder rekonstruktiven Chirurgie häufig sind.

Speziell nach Bypassoperationen, Replantationen oder freiem Gewebettransfer ist eine optimale Antikoagulationstherapie für den Erfolg der Operation mitentscheidend (HESS et al., PLECHA et al., SERAFIN et al., STURZENEGGER et al.). In der Vergangenheit sind daher viele Anstrengungen unternommen worden, um neue Therapieansätze in der Klinik zu etablieren (BERGENTZ et al., FERLITO et al., PORTER et al., RODRÍGUEZ VEGAS et al.). Die Frage nach der optimalen therapeutischen Vorgehensweise zur effektiven Thromboseprophylaxe, gerade auch nach mikrochirurgischen Eingriffen, ist allerdings noch nicht abschließend beantwortet (RODRÍGUEZ VEGAS et al.). Aus diesem Grund haben wir im Rahmen dieser Arbeit, mit unserem Model rekombinantes Hirudin auf seine Wirksamkeit in Mikrogefäßen getestet.

Hirudinpräparate, bekannt als sehr wirkungsvolle, direkte Thrombinantagonisten, repräsentieren eine Gruppe von homologen Polypeptiden. Die heute zur Verfügung stehenden rekombinanten Wirkstoffe leiten sich ab von einem Speichelbestandteil des seit Jahrhunderten in der Medizin bekannten „*Hirudo medicinalis*“ (med. Blutegel), der auch heute noch u.a. in der Plastischen Chirurgie bei Perfusionsstörungen nach freiem Gewebettransfer zur Anwendung kommt (KNOBLOCH et al.). Rekombinante Hirudine (r-Hirudine) wurden für die Prophylaxe und Therapie der Thrombose entwickelt (TEN CATE et al., SCHROR et al., MUREEBE). Sie besitzen eine sehr hohe und spezifische Affinität zu freiem

und auch zu fibrin gebundenem Thrombin (MUREEBE, WALLIS) und sind somit in der Lage die Anlagerung von Thrombin an Blutzellen und somit auch die thrombininduzierte Plättchenaggregation erfolgreich zu inhibieren (MARKWARDT 1994, GREINACHER et al.). Diese Eigenschaften machen r-Hirudin zu einem vielversprechenden Kandidaten für den Einsatz bei der Prophylaxe von Thrombosen bei mikrochirurgischen Eingriffen.

Unter Verwendung dieses Tiermodells waren wir somit in der Lage die Charakteristika arteriöler und venöser Thrombusentstehung wie auch eine mögliche Gefäßrekanalisation zu beurteilen und damit erste Untersuchungen an potenziell antithrombotisch und thrombolytisch wirksamen Substanzen durchzuführen.

## **Ziel der Studie**

Die Entwicklung neuer, effizienter, gut verträglicher und möglichst nebenwirkungsarmer Präparate zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen sind, nach wie vor, Ziel wissenschaftlicher Forschung (HIRSH et al.).

Ziel unserer Studie war es, für die Entwicklung und Testung neuer Wirkstoffe ein valides, tierexperimentelles in vivo Modell zu etablieren, das nicht nur die Beurteilung der Thrombusentstehung und mögliche Rekanalisation, sondern auch die Beobachtung mikrozirkulatorischer Parameter und stattfindender Leukozyten-Zell-Interaktionen in ein und demselben Gefäß erlaubt. Darüber hinaus sollte, nach erfolgreicher Etablierung des Versuchsaufbaus, r-Hirudin, eine vielversprechende antithrombotisch und thrombolytisch wirkende Substanz, auf ihre Effektivität in Mikrogefäßen überprüft werden.

Folgende Fragen sollen beantwortet werden:

1. Führt die angewandte photochemische Reaktion zur Entstehung eines Thrombus in Arteriolen und Venolen?
2. Wenn ja, wie stellt sich die Kinetik der Thrombusentstehung und einer möglichen Rekanalisation in Arteriolen und Venolen dar?
3. Welche mikrozirkulatorischen Parameter werden hierbei beeinflusst?
4. Kommt es zu Leukozyten – Endothelzell – Interaktionen und wenn ja, zu welchen?
5. Sind die gewonnenen Ergebnisse mit den Resultaten anderer Arbeitsgruppen bezüglich der Effektivität von Heparin als antithrombotischer und thrombolytischer Wirkstoff vergleichbar (Prüfung der Validität)?
6. Führt die i.v. Applikation von r-Hirudin zu einer verzögerten Thrombusentstehung und/oder verbesserten Rekanalisation in Mikrogefäßen?
7. Wenn ja, welche mikrozirkulatorischen Parameter werden hierbei beeinflusst?

## Material und Methodik

### ***Homozygote Haarlose Maus***

#### *Die Haarlose Maus als Versuchstier*

Der zufällig 1926 in einem Londoner Zoo entdeckte Stamm der haarlosen Maus (BROOKE, HEININGER et al.), der im Gegensatz zur immundefizienten Nacktmaus (PANTELOURIS) über eine intakte Thymusdrüse verfügt und somit ein funktionierendes Abwehrsystem besitzt, verdankt sein fehlendes Haarkleid einem Gendefekt auf dem Chromosom 14 (hr/hr). Bei homozygoter Ausprägung verlieren die Tiere das in den beiden ersten Lebenswochen normal ausgeprägte Fell (Abb. 1) binnen weniger Tage. Gelegentlich nachwachsende Haare gehen sofort wieder verloren, so dass die Mäuse kein Fell besitzen. Dieses Aussehen führt oftmals dazu, dass die Haarlose Maus (Abb. 2) mit der Nacktmaus (nu/nu) verwechselt werden kann, die einen völlig anderen genetischen Ursprung hat (HEININGER et al.).



**Abb. 1:** 10 Tage alte homozygote (hr/hr) Haarlose Maus mit noch vollständigem Haarkleid.

Alle Versuche wurden an 8 - 10 Wochen alten Haarlosen (hr/hr) Mäusen (14) mit einem Körpergewicht von 22 bis 26 g durchgeführt (Genetischer Ursprung: NMRI Maus; Tierzucht des Instituts für klinisch – experimentelle Chirurgie, Univ. Saarland). Die Tiere wurden bei einem 12 stündigen Tag- und Nachtrhythmus in Einzelkäfigen mit Futter (ALMA 0801, Botzenhardt KG, Kempten; 15.000 I.E./kg Vitamin A, 500 I.E.(kg Vitamin D3, 150 mg/kg Vitamin E, 50 mg/kg Vitamin C) und Wasser ad libitum gehalten. Die Raumtemperatur in der Versuchstieranlage betrug konstant 24°C, die Luftfeuchtigkeit 60%.



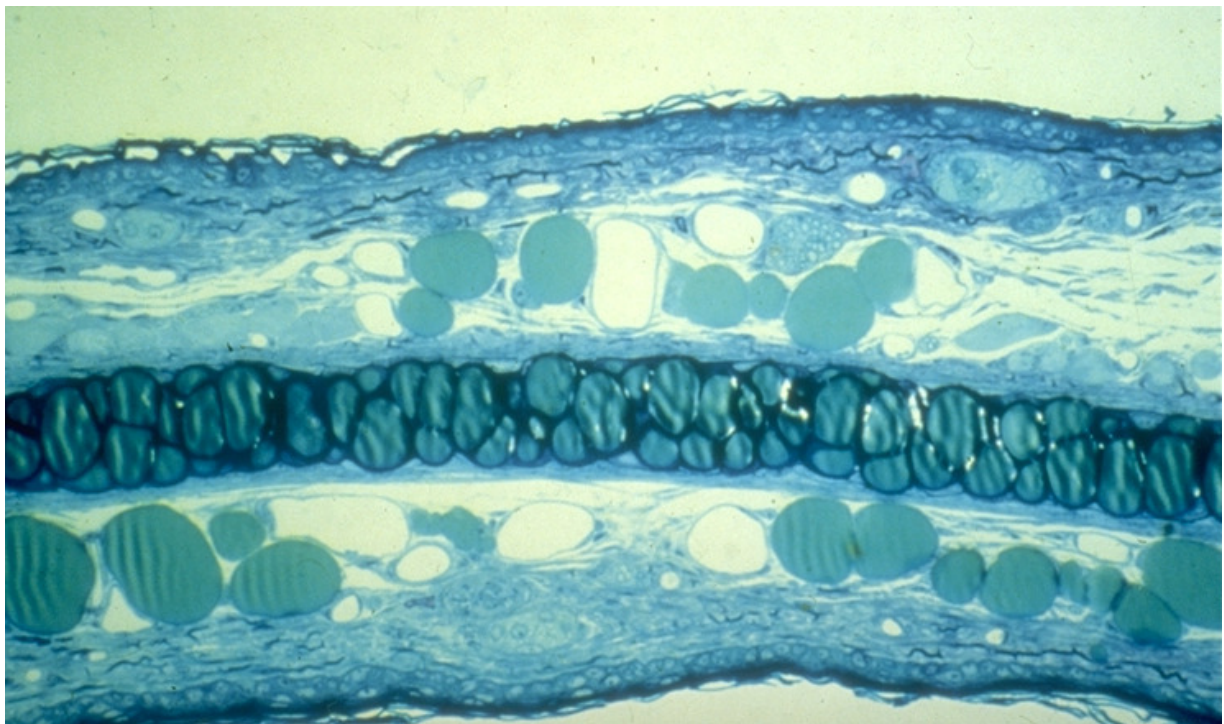
**Abb. 2:** *Homozygote (hr/hr) Haarlose Maus (10 Wochen alt, KG 26g).*

### *Anatomie des Ohres der Haarlosen Maus*

Das Ohr der Haarlosen Maus als Model zur Untersuchung der Mikrozirkulation wurde von ERIKSSON et al. beschrieben und später von anderen Arbeitsgruppen weiterentwickelt (BOYKIN et al., BARKER et al./1, BARKER et al./2, BONDÁR et al.).

Im Vergleich zur Körpergröße der Maus sind die Ohren vergleichsweise sehr groß. Sie messen sowohl in der Länge als auch in der Breite ca. 13 mm (ERIKSSON et al.). Die daraus resultierende Hautoberfläche von 110 - 140 mm<sup>2</sup> entspricht ca. 6% der gesamten Körperoberfläche des Tieres.

Das im Mittel 300 µm dicke Ohr besteht aus einer zentralen, von zwei voll ausgebildeten Hautschichten umgebenen Knorpelschicht (Abb. 3). Das ca. 3 Zelllagen dicke Epithel der Haut ist durch ein hyperkeratotisches Stratum Corneum und durch über die gesamte Oberfläche verteilte Haarfollikel gekennzeichnet. Das Stratum germinativum ruht auf einer dünnen Basalmembran, die durch den Mangel an typischen Hautpapillen einen leicht welligen Verlauf nimmt.

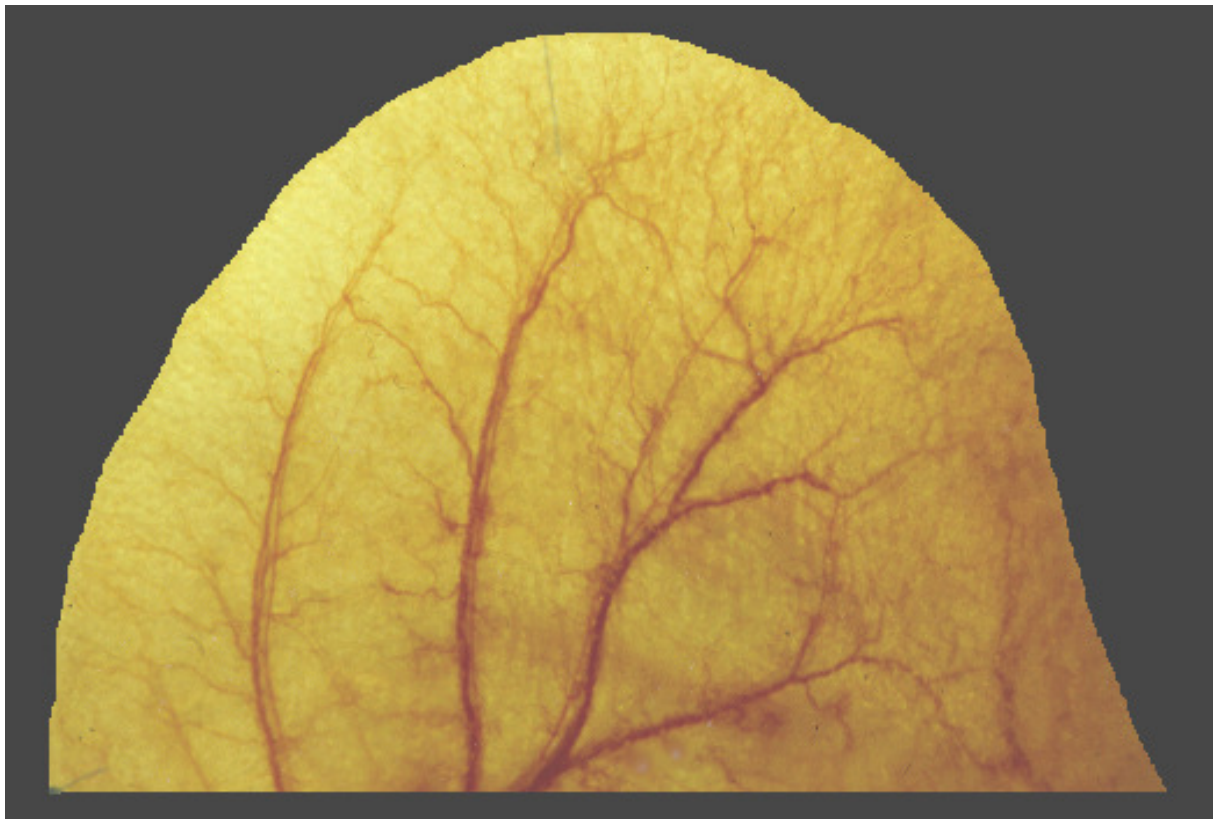


**Abb. 3:** Querschnitt in Giemsa - Färbung (semidünn; 1 µm dick) durch die Ohrmuschel einer Haarlosen Maus (Vergrößerung 190 - fach).



In der darunterliegenden Dermis finden sich alle großen Blutgefäße, Nerven, quergestreifte Muskelfasern, Fettzellen und kollagene Fasern. In der Umgebung der Haarfollikel findet man vereinzelt Talgdrüsen. Weitere Hautanhangsgebilde sind nicht vorhanden (BARKER et al./1).

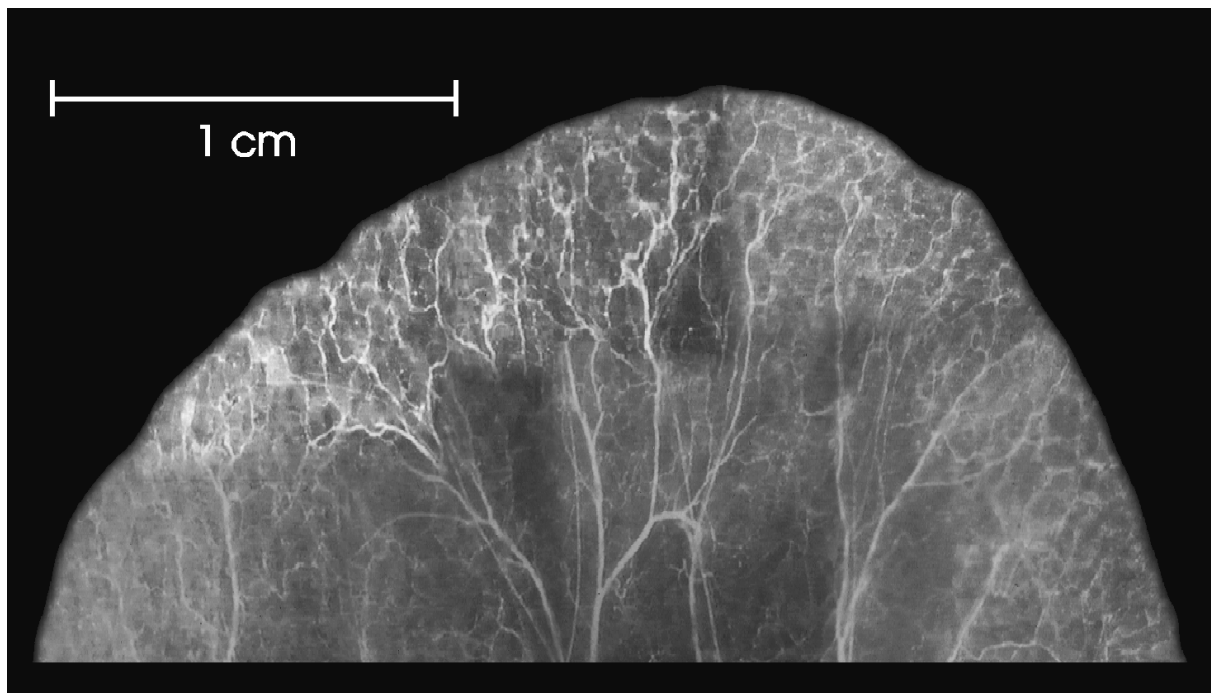
Die zentrale Knorpelstruktur bildet das Stützwerk des Ohres und verleiht ihm seine nach dorsal leicht konvexe Form. Der zum Oberrand sich verjüngende Knorpel (35 - 50  $\mu\text{m}$  im Durchmesser) ist in seinem Verlauf von kreisähnlichen Perforationen unterbrochen, die durch Fettzellen oder Gefäße, welche von der Ventral- zur Dorsalseite des Ohres ziehen, ausgefüllt sind. Der Ohrknorpel selbst besteht aus Lipocondrozyten, die durch einen großen Lipidtropfen gekennzeichnet sind, der von einem dünnen Plasmasaum umgeben ist (BARKER et al./1).



**Abb. 4:** Photomakroskopische Aufnahme vom Ohr der Haarlosen Maus (Gesamtdicke: ca. 300  $\mu\text{m}$ , Gesamtfläche: 110 - 140  $\text{mm}^2$ ) mit den, von der Basis her eintretenden Gefäßbündeln und dem weitverzweigten mikrovaskulären Netzwerk (Vergrößerung 10 - fach).



Die Blutversorgung des Ohres (Abb. 4) wird gewährleistet durch 3 - 4 Gefäßnervenbündel, bestehend aus einer Arteriole, einer Venole und einem Nerven, die gemeinsam an der Basis eintreten bzw. das Ohr verlassen. Die Arteriolen verzweigen sich y - förmig und gliedern sich auf in Gefäße erster bis vierter Ordnung. Bevorzugt in der Peripherie befinden sich arkadenförmige Shuntgefäße zwischen Arteriolen und Venolen niedriger Ordnung (Abb. 4 und 5).



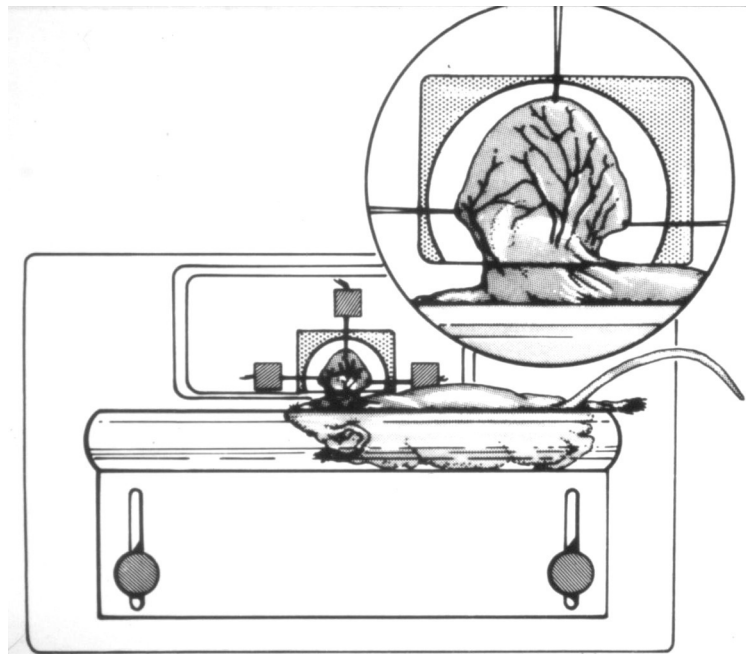
**Abb. 5:** Intravitalmikroskopische Aufnahme des Ohrs der Haarlosen Maus mit den versorgenden Gefäßbündeln und dem umgebenden kapillären Netzwerk nach Applikation des Fluoreszenzfarbstoffes FITC - Dextran (MW 150.000).

Die durchschnittlichen Durchmesser der Venolen liegen bei etwa 20  $\mu\text{m}$  für postkapilläre Venolen und ca. 130  $\mu\text{m}$  für Gefäße 1. Ordnung nahe der Ohrbasis. Die arteriolen Durchmesser differieren zwischen 50 - 60  $\mu\text{m}$  (1. Ordnung) und 10 - 15  $\mu\text{m}$  (4. Ordnung). Die Kapillaren besitzen einen Durchmesser von etwa 5 - 8  $\mu\text{m}$ . Sie bilden in der Dermis ein weitverzweigtes arkadenförmiges dreidimensionales Netzwerk, welches die Haarfollikel rautenförmig umgibt. Neben diesem besonders in der Peripherie vorhandenen kapillären Netzwerk finden sich im mittleren Drittel des Ohres in unmittelbarer Nähe des Knorpels auch parallel

verlaufende Kapillarstrukturen. Dieses Muster ähnelt dem im quergestreiften Skelettmuskel vorkommenden Kapillarnetzen. Die Ausrichtung der Kapillargefäße ist hier senkrecht zur Ohrbasis.

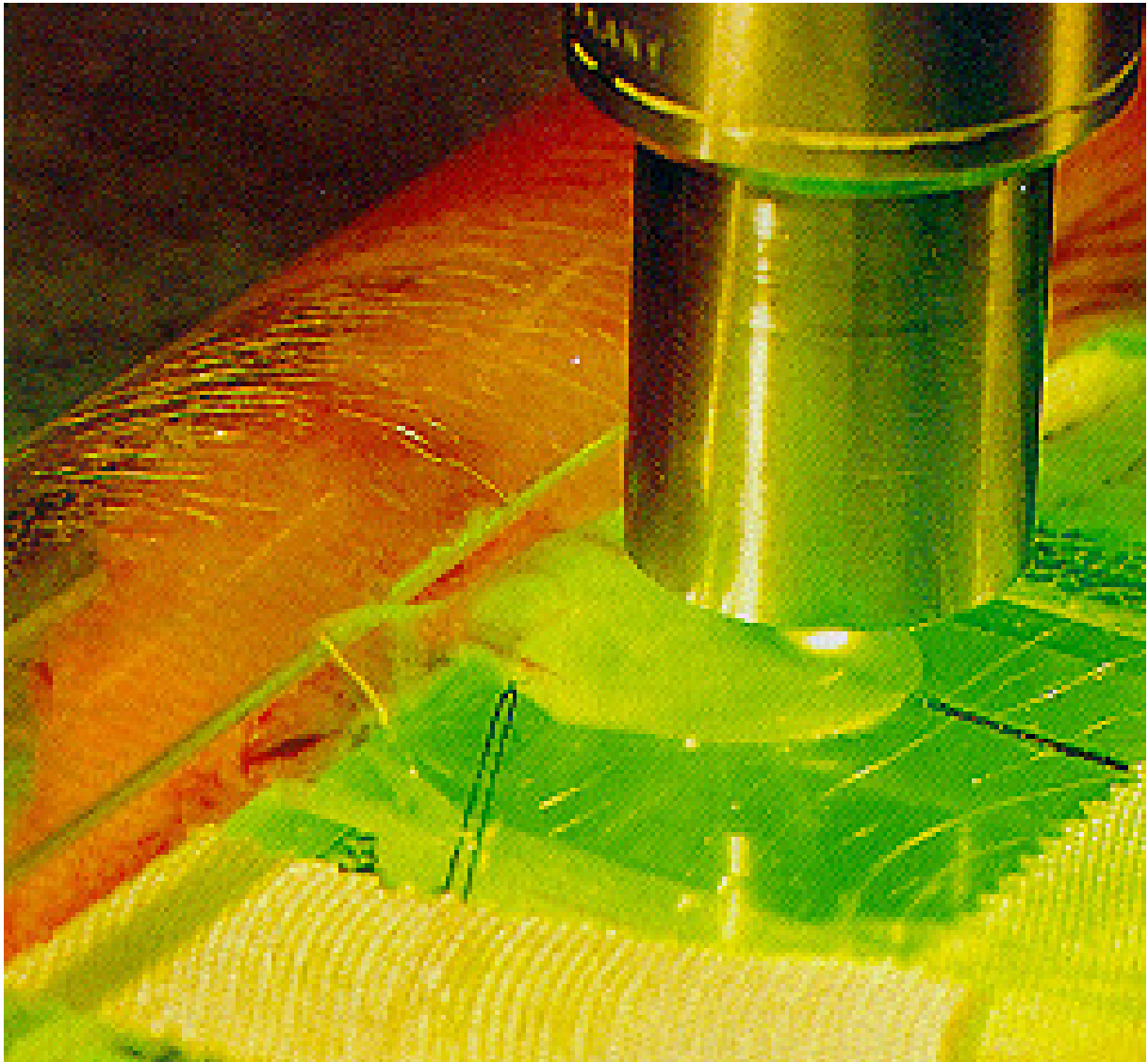
### ***Induktion des Thrombus***

Zur Durchführung der Thrombusinduktion und der begleitenden intravital-mikroskopischen Analyse wurden die Versuchstiere mit Ketamin/Xylazin anästhesiert (90/25 mg/kg Körpergewicht, i.p) und auf einer Plexiglasplattform fixiert (Abb. 6).



**Abb. 6:** Skizze der zur Fixation verwandten Versuchsplattform aus Plexiglas

Die 24 x 14 x 0,5 cm große Plattform besaß eine verschiebbliche, dem Viertel eines Kreises entsprechende Plexiglasröhre mit zwei Feststellschrauben, in der die Versuchstiere auf dem Bauch liegend fixiert wurden. Die Plattform verfügte über einen, in der Mitte eingelassenen Objekträger, auf dem das Ohr für alle Manipulationen ausgelagert wurde. Zur Fixation des Ohres wurde eine handelsübliche impermeable Frischhaltefolie verwendet, um das zu untersuchende Ohr unter Zuhilfenahme von 0,9% Kochsalzlösung flach auf dem eingelassenen Objekträger auszubreiten (Abb. 7).

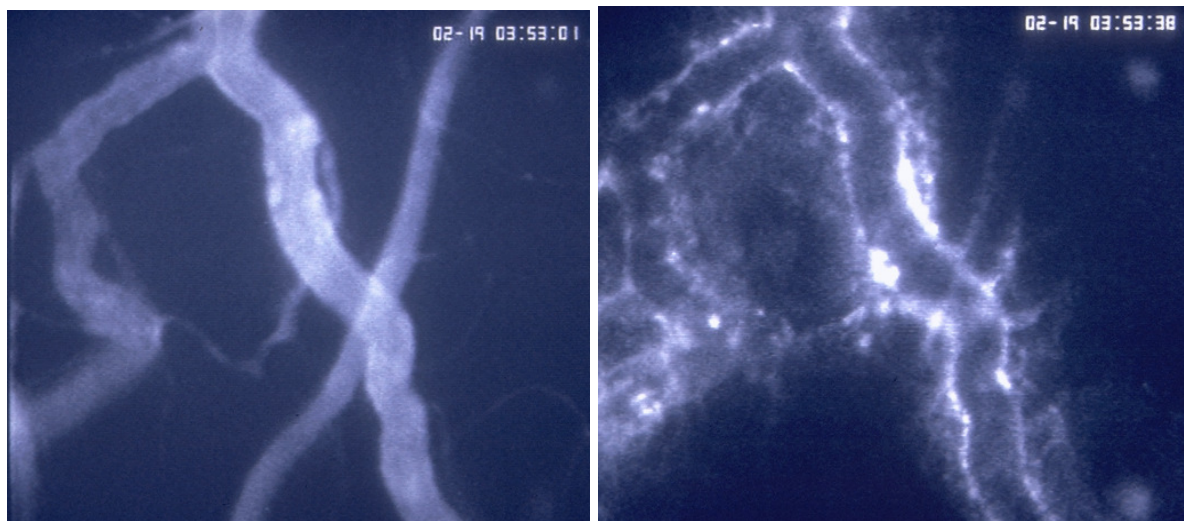


**Abb. 7:** Darstellung einer wachen immobilisierten Maus mit zur intravitalen Fluoreszenzmikroskopie und Thrombusinduktion ausgelagertem Ohr. Auf die hier noch zu sehenden Haltefäden am Ohr konnte aufgrund der durchgeführten Anästhesie in dieser Studie verzichtet werden.

Daraufhin wurden die anästhesierten Versuchstiere unter dem Intravital-Mikroskop (Leitz Orthoplan, Leica, Wetzlar, Deutschland) platziert und das zur Thrombusinduktion verwandte x63 Wasserimmersionsobjektiv aufgesetzt und fokussiert (Abb. 7).

Nach i.v. Injektion in die Schwanzvene von 0.15ml hochmolekularem Dextran gekoppelten Fluoreszein - Isothiozyanat (5%, MG 150.000, Exzitationsmaximum 490 nm, Sigma, St.

Louis, USA) und Rhodamine 6G als Leukozytenmarker (0,05%, 0,1 ml, MG 479, Exzitationsmaximum 560 nm, Sigma, St. Louis, USA) erfolgte die photochemische Trombusinduktion. Anschließend wurden die zuvor ausgewählten Mikrogefäße (beispielhaft Abb.8) durch kontinuierliche Lichtexposition (100W Quecksilberdampflampe) thrombosiert. Die Lichtexposition wurde 10s. nach komplettem Gefäßverschluss beendet (Abb. 9).

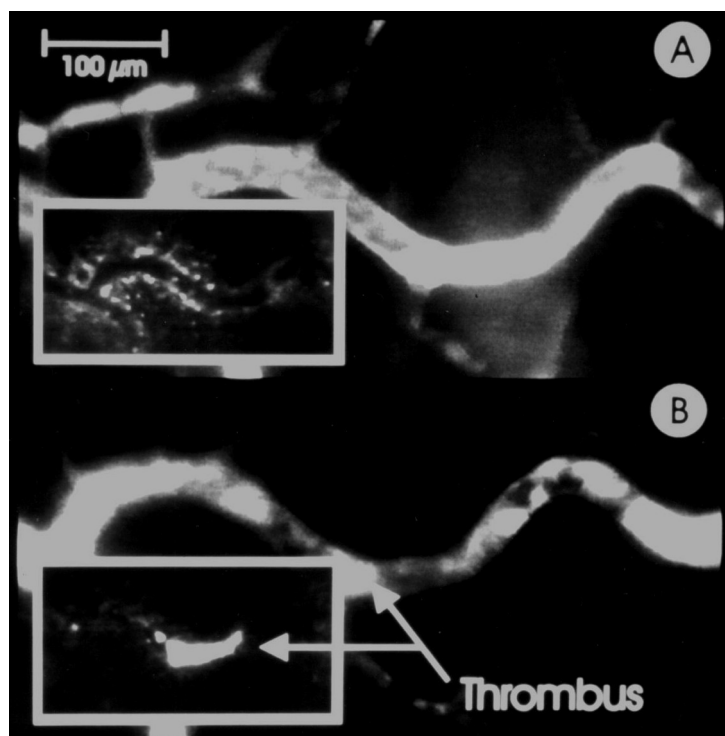


**Abb. 8:** Links: Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Arteriole und Venole nach Applikation von FITC-Dextran 150.000 und Rhodamin 6G unter Ausgangsbedingungen ( $I_2$  – Blaufilter). Rechts: Dieselben Mikrogefäße unter Verwendung eines  $N_2$  - Grünfilters zur Darstellung der Leukozyten. Gesamtvergrößerung 560 - fach.

### ***Intravitale Fluoreszenzmikroskopie***

Die mikrozirkulatorischen Parameter wurden unter Zuhilfenahme intravitaler Fluoreszenz-Mikroskopie mit einem Leitz Orthoplan Mikroskop und einem x25 Wasserimmersionsobjektiv erfasst (Abb. 10). Der gesamte Versuchsablauf erfolgte bei einer konstanten Raumtemperatur von 23°C.

Zur Kontrastverstärkung für die Darstellung der Mikrozirkulation wurde FITC-Dextran 150.000 verwendet. Diese Substanz bindet weder an Endothelzellen noch an individuelle Blutzellen und zeigt, aufgrund seiner chemischen Struktur auch keine Extravasation unter physiologischen Bedingungen.



**Abb. 9:** Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Venole nach Applikation von FITC-Dextran 150.000 und Rhodamin 6G unter (A) Ausgangsbedingungen und (B) direkt nach Thrombusbildung ( $I_2$  – Blaufilter). Kleine Bilder: Dieselben Mikrogefäße unter Verwendung eines  $N_2$  - Grünfilters zur Darstellung der Leukozytenreaktion vor (oben) und nach (unten) Thrombusentstehung. Gesamtvergrößerung 560 - fach.

Zur Beurteilung der Leukozytengeschwindigkeit, des korrespondierenden Fließverhaltens sowie der stattfindenden Leukozyten – Endothel – Interaktionen wurde den Versuchstieren Rodamin 6G (MW 476) in bereits beschriebener Weise appliziert.

Beide Farbstoffe verbleiben für ca. 4h (FITC-Dextran) respektive 1h (Rhodamine 6G) in der Zirkulation und werden über die Leber- und Nierenfunktion aus der Zirkulation eliminiert. Beide Fluoreszenzmarker wurden sowohl unmittelbar vor Thrombusinduktion verabreicht als auch kurz vor der Kontrolluntersuchung 24 Stunden nach Auslösung der Gefäßthrombosierung.

Der für unsere Untersuchungen eingesetzte experimentelle Arbeitsplatz stellt sich wie folgt dar (Abb. 10):

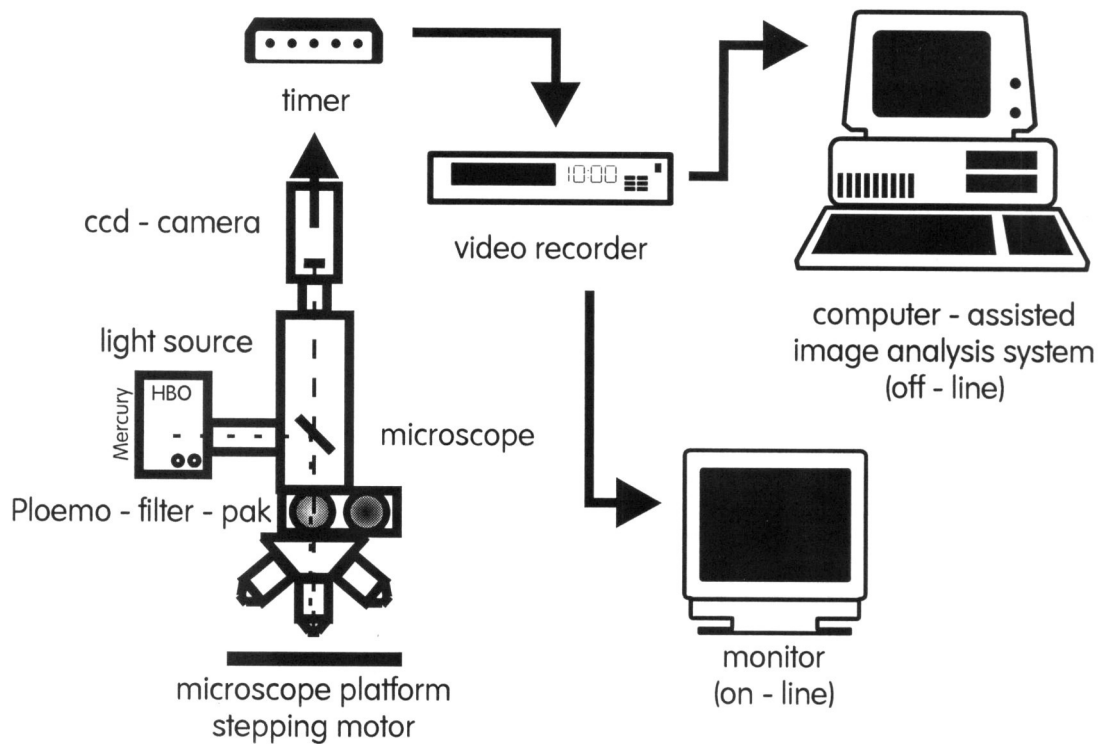
Eine Aufricht-Mikroskop-Einheit bestehend aus einer 100W Quecksilberdampfampe und einem Ploemopack - Filterblock bestückt mit einem I<sub>2</sub> Blaufilter (450-490nm Exzitationswellenlänge, >515nm Emissionswellenlänge) sowie einem N<sub>2</sub> Grünfilter (530-560nm Exzitationswellenlänge, >580nm Emissionswellenlänge).

Eine computergesteuerte von zwei Elektromotoren betriebene Plattform unterhalb des Mikroskops, die es erlaubt einzelne, zuvor definierte Untersuchungspunkte auf dem Ohr wiederholt anzusteuern, umso während des gesamten Experiments Untersuchungen an den identischen Mikrogefäßen durchführen zu können.

Die Aufnahme der mikroskopischen Bilder zur späteren off-line Auswertung erfolgte mittels einer angeschlossenen CCD - Videokamera (CF8/1 FMC, Kappa GmbH, Gleichen, Deutschland). Die Archivierung erfolgte auf handelsüblichen S-VHS Videobändern (Abb. 11).

Die off-line Auswertung der intravitalmikroskopischen Aufnahmen erfolgte unter Zuhilfenahme computergestützter Bildverarbeitung. Die Einheit setzte sich zusammen aus einem Standard - PC (Intel Pentium, 4MB DRAM, 1MB Graphikkarte, DOS-Betriebssystem) mit Video/ Overlay - Karte (Matrox, IP8-AT/2MC, Moores/NY, USA), Summasketch Digitalisierbrett (Summagraphic Corp., München) und einem 17" - Monitor sowie einem hochauflösenden Farbmonitor (PVM 1371-QM, Sony Corp., Tokio, Japan) zur Bildanalyse. Als Bearbeitungssoftware kam das Bildanalysesystem CAMAS (Version 3.2, Zeintl Software Engineering, Heidelberg; ZEINTL et al.) sowie zur Messung der Blutzellgeschwindigkeit das

Auswerteprogramm CapiFlow (Version 3.1, CapiFlow AB, Kista, Schweden; FAGRELL et al.) zur Anwendung.



**Abb. 10:** Schematische Darstellung des experimentellen Aufbaus zur intravital-mikroskopischen Analyse.



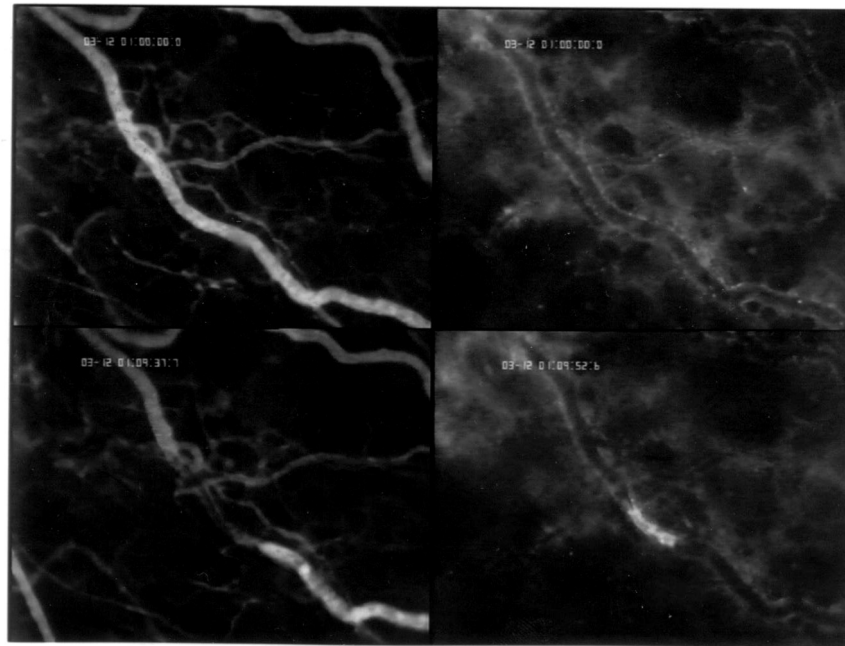
## ***Mikrozirkulationsanalyse***

Die Kinetik der Thrombusentstehung (Veränderung des Innendurchmessers des beobachteten Gefäßes bedingt durch die provozierte Leukozyten-/Plättchenadhäsion am Endothel der Gefäßwand) sowie die nachfolgend aufgeführten mikrozirkulatorischen Parameter wurden unter Zuhilfenahme der bereits beschriebenen off-line Auswerteeinheit (siehe *experimenteller Arbeitsplatz*) quantifiziert. Im Einzelnen wurden folgende Mikrozirkulationsparameter erfasst:

- Gefäßdurchmesser
- Verlust der Endothelintegrität
- Geschwindigkeit der Erythrozyten
- Leukozyten – Endothelzell Interaktionen
- Vasomotion

Die Kinetik der Thrombusentstehung (Abb. 11) wurde zu folgenden Zeitpunkten quantifiziert:

- 1) Beobachtung der ersten Leukozyten-/Plättchenadhäsionen an der Endothelwand
- 2) Verringerung des Gefäßdurchmessers durch den wachsenden Thrombus auf 50% des Ausgangswertes
- 3) Stillstand des Blutflusses durch komplette Verlegung des Gefäßlumens aufgrund des entstandenen Thrombus
- 4) Evaluation einer möglichen Gefäßrekanalisation 5min, 30min und 24h nach Thrombusinduktion.



**Abb. 11:** Intravitalmikroskopische Aufnahme einer Venole zu Beginn des Experiments (baseline) unter Verwendung des  $I_2$  Blaufilters (oben links) und des  $N_2$  Grünfilters (oben rechts). Dasselbe Gefäß unmittelbar nach Thrombusinduktion in gleicher Darstellungsweise (unten).

Die Erfassung der Mikrozirkulationsparameter erfolgte ebenfalls zu den Zeitpunkten baseline, 5min, 30min und 24h unter Anwendung folgender Messungen:

- 1) Die Bestimmung der Gefäßdurchmesser erfolgte mittels Videoanalyse unter Verwendung des Videoanalysesystems Capimage (Capimage; Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland, ZEINTL et al.).
- 2) Verlust der Endothelintegrität (=Extravasation von FITC-Dextran) wurde gemessen anhand des Verhältnisses von extravaskulärer zu intravaskulärer Fluoreszenzintensität (Videoanalysesystem: Capimage; Zeintl Software, Heidelberg, Deutschland, ZEINTL et al.).
- 3) Die Erythrozytengeschwindigkeit wurde mit der videodensitometrischen Zweifenster - Technik gemessen. Dabei handelt es sich um ein photometrisches Verfahren unter

Verwendung von Photodioden, die in Form zweier Fenster über dem zu messenden Gefäß stromauf- und stromabwärts auf dem Monitor positioniert werden. Die durch den Fluß der Blutsäule in den Fenstern erzeugten Videosignale werden in elektronische Muster transformiert und miteinander verglichen, sodass es möglich ist, unter Berücksichtigung des Fensterabstandes, der Bildvergrößerung und des Zeitraums bis das Videosignal des ersten Fensters sich im Zweiten wiederholt, mittels Kreuzkorrelation die Blutzellgeschwindigkeit zu ermitteln (CapiFlow, Capiflow AB, Kista, Schweden, FAGRELL et al.). Es wurden pro Gefäß jeweils zwei Messungen durchgeführt, deren Mittelwert dann in die Auswertung einging.

- 4) Unter Verwendung der gewonnenen Parameter Gefäßdurchmesser und Erythrozytengeschwindigkeit wurde ebenfalls der segmentale Blutvolumenfluss (wall shear rate) errechnet. Üblicherweise erfolgt dies durch Multiplikation von Fließgeschwindigkeit und Gefäßquerschnitt. Da die Fließgeschwindigkeit wie oben beschrieben allerdings im Zentralstrom gemessen wird, findet aufgrund des parabolischen Geschwindigkeitsprofils in Mikrogefäßen (geringere Randgeschwindigkeiten im Vergleich zum Zentralstrom; BAKER et al.) eine Überschätzung der gesamten Fließgeschwindigkeit statt. Der bei verschiedenen Durchmessern variierende Faktor, der die Diskrepanz zwischen Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom gegenüber der durchschnittlichen Fließgeschwindigkeit berechnet, wird nach den Erstbeschreibern als *Baker - Wayland Proportionalitätsfaktor* bezeichnet (BAKER et al.). Für Gefäße zwischen 20 und 60 µm wird ein Faktor von 1,6 angegeben (BAKER et al.). Daher wurde in der vorliegenden Studie bei der Berechnung des segmentalen Volumenflusses in Venolen und Arteriolen (20 - 60 µm) dementsprechend ein Faktor von 1,6 verwendet.

Folgende Formel wurde zur Berechnung herangezogen:

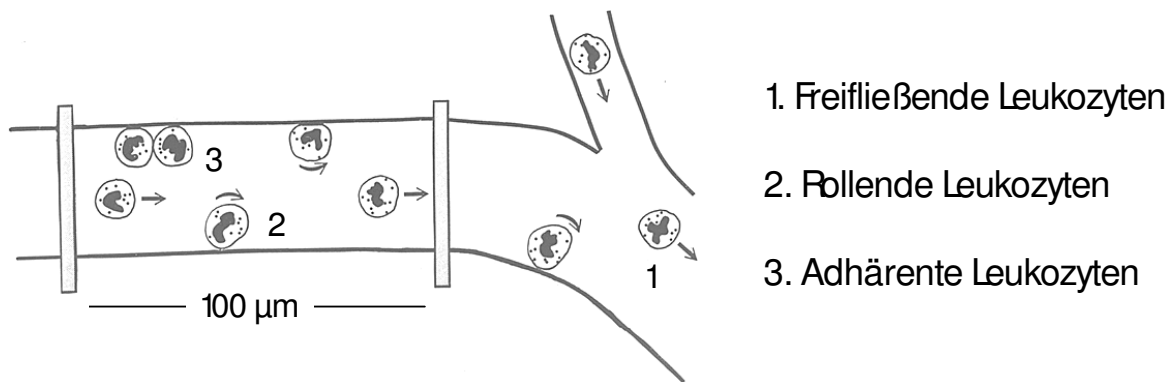
$$\text{Wall shear rate } (\gamma) = 8 \times d / (v/K)$$

wobei  $d$  den Durchmesser des Einzelgefäßes,  $v$  die Fließgeschwindigkeit im Zentralstrom und  $K$  den Baker - Wayland Faktor (hier 1.6) repräsentieren.

- 5) Die Interaktion von Leukozyten mit dem Endothel (Abb. 12) wurde anhand des Leukozyten Flux und der Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand untersucht. Der Leukozyten Flux ist hierbei definiert als die Zahl der Leukozyten, die ein zuvor definiertes Beobachtungsfenster in dem untersuchten Gefäß innerhalb des

Beobachtungszeitraums von 30 Sekunden passieren. Die Leukozytenadhäsion ist definiert als die Anzahl der weißen Blutkörper in einem Beobachtungsfenster von 100µm Gefäßlänge, die an der Gefäßwand adhäreren und sich über den Untersuchungszeitraum von 30 Sekunden nicht von dieser lösen.

- 6) Das Auftreten von Vasomotion wurde in seiner Häufigkeit dokumentiert. Definiert wurde es als rhythmischer Wechsel des Durchmessers desselben, beobachteten Gefäßabschnittes in einem Rhythmus von 2 – 30 Zyklen pro Minute.



**Abb. 12:** Graphische Darstellung des definierten Beobachtungsfensters zur Erfassung des Leukozytenfließverhaltens in Mikrogefäßen.

## ***Elektronen - Mikroskopie***

Zur elektronenmikroskopischen Untersuchung wurden die Ohren in kleine Stücke geschnitten (2x2mm) und nachfolgend fixiert. Die Fixierung erfolgte mit Glutaraldehyd und Formalaldehyd in einem 0,2 molaren Cacodylat-Puffer (ph 7.2) für 4 Stunden bei 4°C (KARNOVSKY et al.). Anschließend wurden die Präparate dreimal mit Sucrose 7,55% in 0.1 molarem Cacodylat-Puffer (ph 7.2) gewaschen und daraufhin mit Osmiumtetroxid mittels der Methode nach Caulfield für 4 Stunden bei 4°C fixiert.

Nach Dehydration in Aceton erfolgte die Einbettung der Präparate in Araldit.

Die Proben wurden zur Weiterbearbeitung mittels eines OmU3 – Mikrotoms (Reichert, Wein, Österreich) geschnitten.

Semidünnschnitte (0.5µm) wurden abschließend mit Methylenblau gefärbt, Ultradünnschnitte wurden mit Uranylacetat / Citrat aufbereitet.

Bei der Untersuchung mittels Elektronenmikroskopie wurde neben der Analyse der Thrombusstruktur und der oberhalb des Thrombus gelegenen Gefäßregion insbesondere die Veränderung des Endothels im Bereich der Gefäßokklusion genau untersucht. Von besonderem Interesse war hierbei der durch die Thrombusinduktion entstandene Endothelschaden sowie der Zustand der involvierten Thrombozyten und Leukozyten.

## ***Untersuchte Wirkstoffe***

### *Heparin*

Heparin-Natrium ist das Natriumsalz eines sulfatierten Glycosaminoglycans, das im Gewebe von Säugetieren vorkommt. Bei der vollständigen Hydrolyse werden D-Glucosamin, D-Glucuronsäure, L-Iduronsäure, Essigsäure und Schwefelsäure freigesetzt. Die Substanz hat die charakteristische Eigenschaft, die Blutgerinnung zu verzögern. Die gerinnungshemmende Wirkung beruht darauf, dass im Blut Antithrombin III zirkuliert, ein Enzym, das aktivierte Gerinnungsfaktoren wie Thrombin hemmt. Heparin bindet nun an Antithrombin III, was die von diesem katalysierte Reaktion etwa 1000-fach schneller ablaufen lässt. Heparin wird angewandt zur Prophylaxe und Therapie von Thrombosen. Seine Dosis wird nicht in Gramm angegeben, sondern in Internationalen Einheiten (IE): Eine Einheit verhindert die Gerinnung von 1 ml citrathaltigem Plasma nach Zugabe von  $\text{CaCl}_2$  bei 37 °C über eine Stunde (AKTORIES et al.).

Um unser Modell auf seine Validität zu überprüfen, verwendeten wir handelsübliches Heparin-Natrium (Heparin Immuno 1000U/ml, Ebewe Pharma, Unterach, Deutschland) in derselben Dosierung (300U/kg KG.) wie es in anderen tierexperimentellen Studien zum Einsatz kam (BERNAT et al, SUGIDACHI et al.).

## *Hirudin*

Bereits vor mehr als 3000 Jahren verwendete man Hirudin indirekt in Form des Blutegels zur Behandlung verschiedenster Krankheiten. Die gerinnungshemmende Aktivität im Speichel des Blutegels entdeckte aber erst der britische Physiologe John Berry HAYCRAFT im Jahre 1884. YACOBI gab dann im Jahre 1904 den von ihm untersuchten Blutegelextrakt den Namen Hirudin. In die klinisch-praktische Arbeit wurde Hirudin in den 1920er Jahren von dem französischen Chirurgen Termier durch seine Blutegeltherapie bei frischen Thrombosen eingeführt (GREINACHER et al.).

Nach Entdeckung des spezifischen Wirkmechanismus durch MARKWARDT im Jahre 1955, folgte 20 Jahre später die Entdeckung der Primärstruktur des Proteins und 1986 die erfolgreiche gentechnologische Herstellung. Damit war der Startschuss für umfangreiche pharmakologische und klinische Studien, die bis heute andauern erfolgt (MARKWARDT 1994, GREINACHER ET AL.).

Hirudinpräparate, bekannt als sehr wirkungsvolle, direkte Thrombinantagonisten, repräsentieren eine Gruppe von homologen Polypeptiden bestehend aus 65 Aminosäuren. Durch die irreversible Bindung an die Fibrinogenbindestelle von Thrombin (F-IIa) verschließt es mit einem Teil des Moleküls das aktive Zentrum des Thrombins, wodurch dessen Wirkung blockiert wird.

Für unsere Untersuchungen verwendeten wir das rekombinante Hirudin HBW 023 (rekombinantes [Leu0, Thr1] Desulfatohirudin, Hoechst Marion Roussel, Frankfurt, Germany) in einer Dosierung von 1mg/kg Körpergewicht, das uns freundlicherweise von der Abteilung für biomedizinische Forschung der Firma Hoechst Marion Roussel zur Verfügung gestellt wurde.

## ***Versuchsdesign***

Die vorliegende Studie wurde an insgesamt 4 Untersuchungsgruppen durchgeführt.

Die erste Versuchsgruppe bestand aus 10 unbehandelten haarlosen Mäusen.

Die zweite Gruppe (Validierungsgruppe) bestand aus 6 Tieren, die 10min vor Beginn des Experiments eine Einzeldosis Heparin (300U/kg Körpergewicht, i.v.) erhielten.

Die dritte bzw. vierte Gruppe bestand aus jeweils 8 Tieren, die 10min vor Beginn des Experiments eine Einzeldosis r-Hirudin HBW023 (1mg/kg Körpergewicht, i.v.) bzw. Kochsalzlösung (Kontrollgruppe) erhielten.

Alle Versuchstiere wurden nach Beginn des Experiments in Einzelkäfigen gehalten.

Alle Tiere und Interventionen wurden anhand eines standardisierten Protokollbogens dokumentiert.

In allen Gruppen wurde ein identischer Versuchsablauf durchgeführt (Abb. 13). Nach Sedierung der Versuchstiere erfolgte die i.v. Injektion der benötigten Fluoreszenzfarbstoffe (+ Gruppe 2-4: Vorbehandlung) in die Schwanzvene. Nachfolgend wurden die Tiere unter dem Mikroskop platziert und die Beobachtungsfenster definiert und im PC abgespeichert, sodass sie im Laufe des Experiments wiederholt aufgesucht werden konnten. Hierbei wurden jeweils ein bis zwei Arteriolen sowie zwei bis drei Venolen pro Ohr ausgewählt.

Daraufhin erfolgte an jedem Gefäß die Aufzeichnung der Untersuchungsparameter unter Ausgangsbedingungen (baseline). Im Anschluss daran wurde nacheinander die Thromboseinduktion ausgelöst/beobachtet und zu den Zeitpunkten 5min und 30min nachuntersucht.

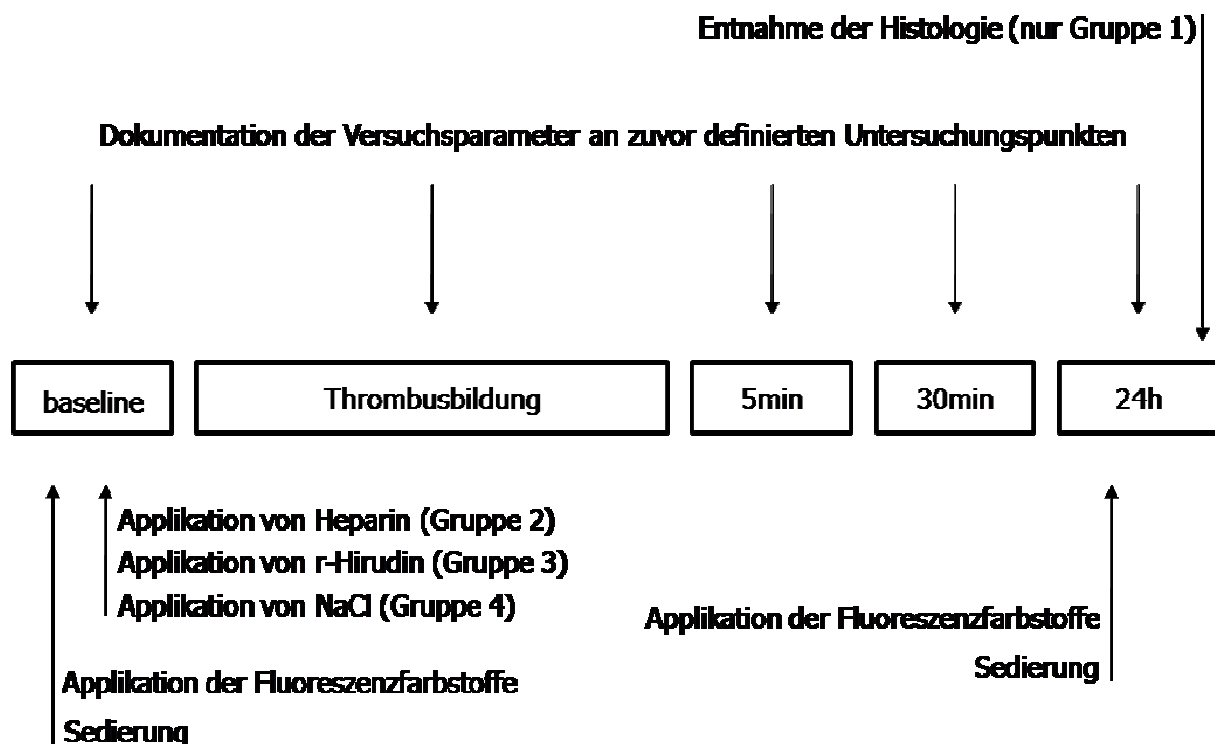
Nach 24 Stunden wurden bei identischer Versuchsvorbereitung die definierten Untersuchungspunkte erneut aufgesucht und dokumentiert.



Obgleich das Ohr der haarlosen Maus ein einfaches, wenig stör anfälliges in vivo Modell zur Untersuchung der kutanen Mikrozirkulation darstellt und somit auch die Ausfallsquote während der Versuche nur gering ist, haben wir dennoch folgende Abbruchbedingungen definiert:

- Gewebeschaden, bedingt durch Verletzung der Tiere im Käfig
- Starker Gewichtsverlust während des Versuches (>15%)

Das Versuchsprotokoll wurde von der lokalen Tierschutzkommission geprüft und genehmigt.



**Abb. 13:** Versuchsprotokoll für die vorliegende Studie

### ***Statistische Auswertung***

Die Berechnung der Gesamtanzahl für die statistische Auswertung erfolgte, unter Berücksichtigung von Erfahrungswerten früherer Studien. Hierbei wurde ein  $\alpha$  - Fehler von 5% und ein  $\beta$  - Fehler von 1 % zugrundegelegt.

Die statistische Analyse der Daten wurde unter Zuhilfenahme des Softwarepaketes SigmaStat vorgenommen (Version 1.0, Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA).

Nach Testung auf Normalverteilung der vorliegenden Daten und einer ANOVA kam der "Students t - test" zum paarweisen Vergleich in Kombination mit der Bonferroni - Holm Korrektur zur Anwendung. Für die statistische Beurteilung des Auftretens von Vasomotion und Rekanalisation von Gefäßen verwendeten wir den  $\chi^2$ -Test. Mittels der „Pearson product moment correlation“ bestimmten wir die Abhängigkeit zwischen der Zeit der Lichtexposition und des Thrombuswachstums.

Als Signifikanzniveau wurde ein p - Wert von  $<0,05$  festgelegt.

Für die graphische Aufarbeitung wurden die erhaltenen Daten als Mittelwert  $\pm$  Standardfehler des Mittelwertes (SEM) angegeben.

## Ergebnisse

### ***Thrombusbildung und vaskuläre Rekanalisation***

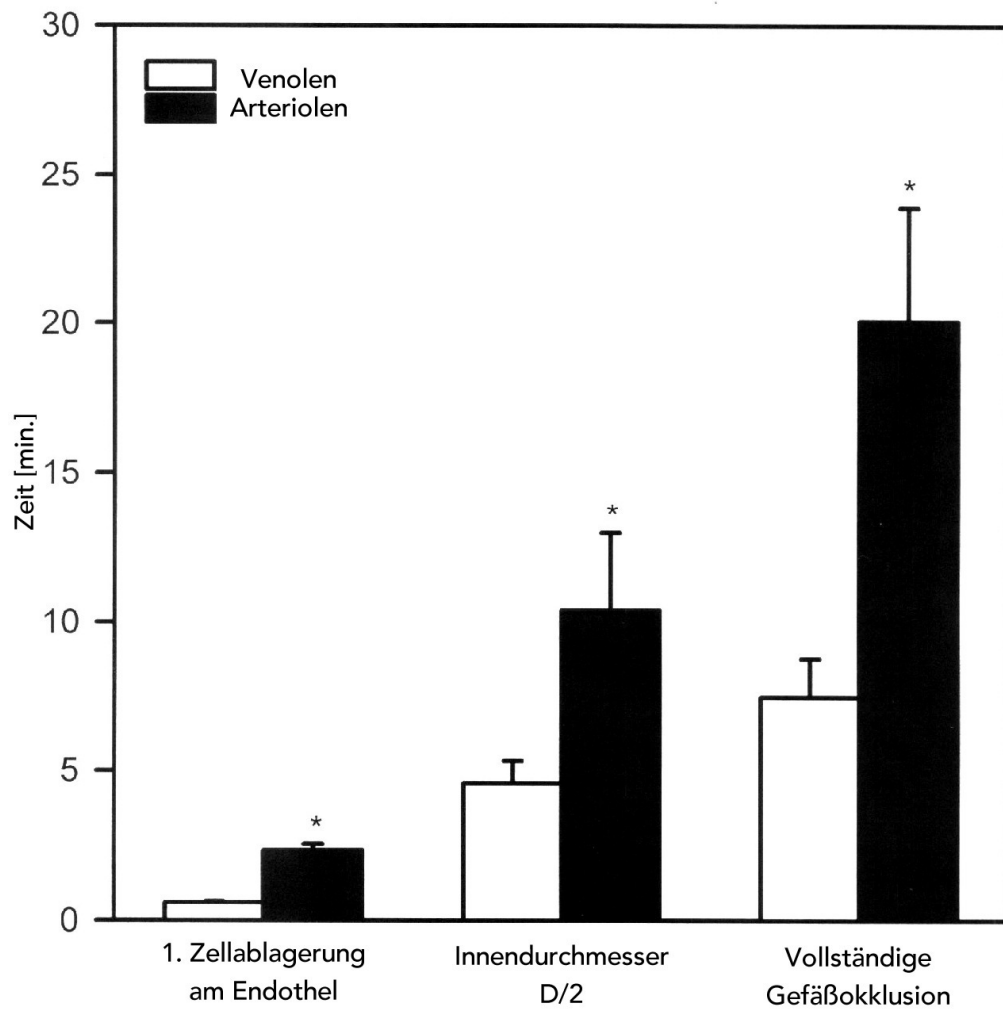
Die durch kontinuierliche Lichtexposition ausgelöste photochemische Reaktion führte in Venolen zu einer initialen Zellablagerung am Endothel (first cell deposition) nach  $59 \pm 2$  s (Abb. 14). Das Gefäßlumen (Innendurchmesser) verkleinerte sich nach  $275 \pm 46$  s auf 50% bedingt durch den stetig wachsenden Thrombus. Eine begleitende Vaskokonstriktion (=konstante Verringerung des äußeren und inneren Gefäßdurchmessers) konnte hierbei nicht beobachtet werden. Zu einer vollständigen Verlegung des Lumens durch Thrombosierung kam es nach  $449 \pm 78$  s. Die durchgeführte Regressionsanalyse zwischen Dauer der Lichtexposition und Wachstum des Thrombus ergab eine beinahe lineare Korrelation von  $r^2=0.96$  ( $p<0.01$ ).

In den untersuchten Arteriolen vollzog sich die Ausbildung des Thrombus signifikant verzögert ( $p<0.05$ ). Die initiale Zellablagerung am Endothel fand sich hier nach  $139 \pm 13$  s, der vollständige Gefäßverschluss trat nach  $1204 \pm 230$  s ein (Abb. 14). Ähnlich wie in den Venolen bestand auch in Arteriolen eine signifikante Korrelation ( $p<0.05$ ) bezüglich der Dauer der Lichtexposition und des Thrombuswachstums ( $r^2=0.69$ ). Ein arteriöler Vasospasmus konnte nicht beobachtet werden.

Eine frühzeitige Gefäßrekanalisation nach 5min bzw. 30min konnte weder in Venolen noch in Arteriolen beobachtet werden.

Im Gegensatz dazu zeigte sich aber in 75% aller Venolen nach 24 Stunden eine Wiedereröffnung des Gefäßlumens. Jedoch zeigte lediglich eine der thrombosierten Arteriolen eine spontane Rekanalisation ( $p<0.01$ ).

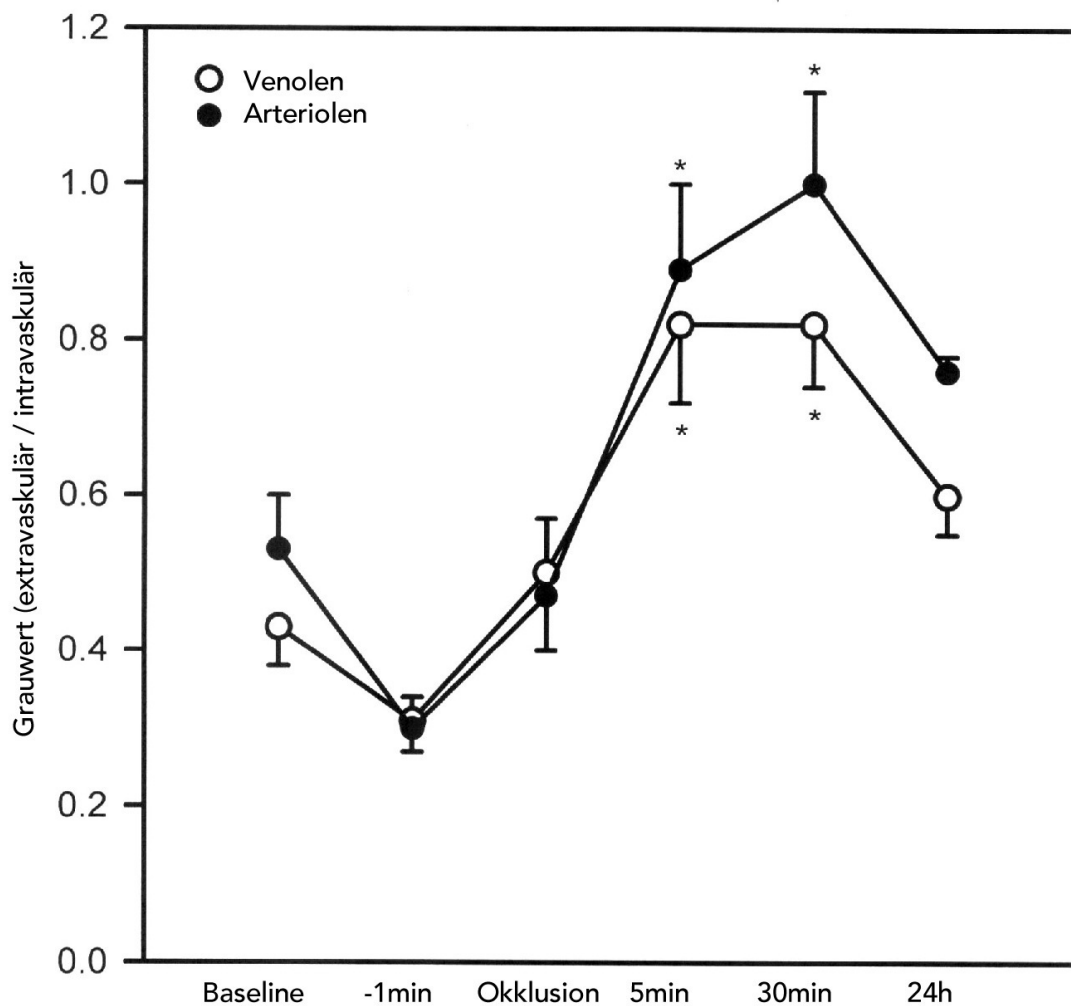
In den rekanalisierten Venolen lag der Innendurchmesser bei  $49 \pm 2.3\%$  des Ausgangswertes. Bei der einzigen spontan wiedereröffneten Arteriole bei 82% des ursprünglichen Wertes.



**Abb. 14:** Kinetik der Thrombusentstehung in Arteriolen und Venolen am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [min] zu den Zeitpunkten: Erste Zellablagerung am Endothel (first cell deposition), Innendurchmesser des Lumens bei 50% (diameter reduction 50%, D/2) und vollständige Gefäßokklusion (complete occlusion). Student's t-Test: \* $p < 0.05$  vs. Venolen.

## Mikrozirkulation

Sowohl in Venolen als auch in Arteriolen zeigte sich in der frühen Phase (5min, 30min) nach vollständiger Thrombosierung (Okklusion) der Gefäße eine dramatische Störung der Endothelintegrität (Extravasation von FITC-Dextran, Abb. 15 und 16). Obgleich sich diese Befunde nach 24 Stunden deutlich verbesserten, konnte aber in allen Gefäßen der Ausgangswert (baseline) nicht wieder erreicht werden (Abb. 15).



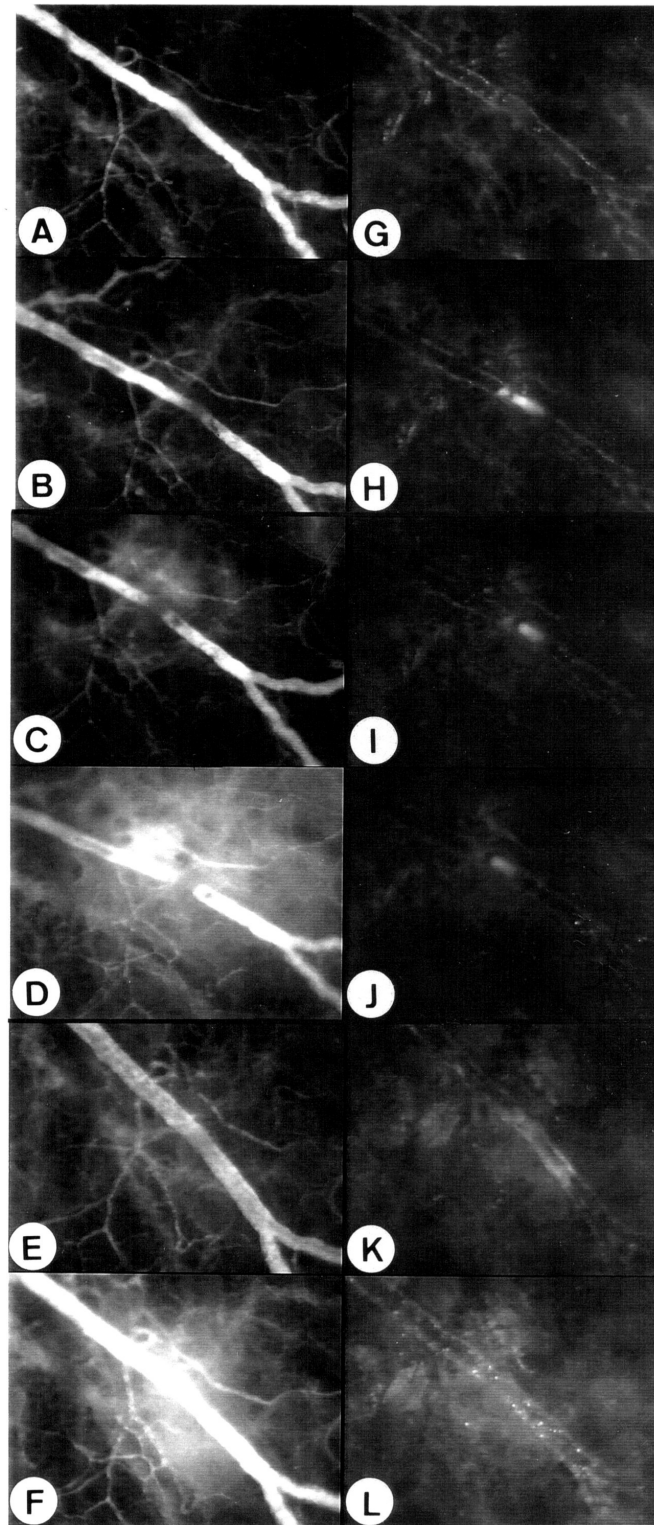
**Abb. 15:** Störung der Endothelintegrität in Arteriolen und Venolen nach erfolgreicher Thrombosierung. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM. One way ANOVA, Student's t-Test mit Korrektur nach Bonferroni Holm: \* $p < 0.05$  vs. baseline.

Bei der Betrachtung der wall shear rate ließen sich in Arteriolen ( $330 \pm 6.2 \text{ s}^{-1}$ ) signifikant höhere Werte nachweisen ( $p < 0.05$ ) im Vergleich zu den untersuchten Venolen ( $100 \pm 1.3 \text{ s}^{-1}$ ). Jedoch zeigten sowohl Arteriolen wie auch Venolen eine signifikant reduzierte wall shear rate eine Minute vor dem kompletten Gefäßverschluss (Arteriolen:  $110 \pm 2.1 \text{ s}^{-1}$  Venolen:  $60 \pm 1.7 \text{ s}^{-1}$ ). Nach Rekanalisierung des Lumens kam es allerdings zu einer Normalisierung des Blutvolumenflusses auf Ausgangsniveau (Arteriole:  $370 \text{ s}^{-1}$  Venolen:  $120 \pm 2.4 \text{ s}^{-1}$ ). Ein Vergleich der wall shear rate zu Ausgangsbedingungen und eine Minute vor Gefäßokklusion erbrachte keine signifikanten Unterschiede zwischen Gefäßen, die nach 24 Stunden noch verschlossen waren und solchen, in denen sich der Thrombus gelöst hatte und das Gefäß wieder mit Blut durchströmt wurde.

Das Auftreten von Vasomotion kurz vor dem Gefäßverschluß fand sich in Arteriolen signifikant ( $p < 0.05$ ) gehäuft. Während unter Ausgangsbedingungen lediglich 23% der beobachteten Arteriolen Vasomotion zeigten, stieg der Wert eine Minute vor Okklusion auf 77%.

Im Gegensatz dazu konnten wir keine Vasomotion in Venolen unter Ausgangsbedingungen feststellen, und lediglich 10% der untersuchten Gefäße reagierten mit rhythmischen Veränderungen des Durchmessers eine Minute vor Thrombosierung.

## ***Inflammatorische Antwort***



**Abb. 16:** Intravitalmikroskopische Aufnahme einer postkapillären Venole nach Kontrastverstärkung mit FITC-Dextran (linke Seite) und Rodamin 6G (rechte Seite).

*Die Aufnahmen A&G zeigen den Ausgangsbefund, B&H den Zustand unmittelbar nach Gefäßokklusion, C&I 5min danach, D&J 30min danach, E&K 24h danach sowie F&L 7 Tage nach dem Ereignis. Gut zu erkennen ist der durch Fluoreszenzverstärkung mit Rodamin 6G leuchtende Thrombus aus Trombozyten und Leukozyten (H,I,J). Ebenfalls sehr gut sichtbar die nach Thrombosierung zunehmende Gewebefluoreszenz in der Umgebung des Thrombus durch das aus dem Lumen austretende FITC-Dextran als Nachweis der bestehenden Schädigung des Endothels (C-F). Die Rekanalisation nach 24h (E) lässt sich auch nach 7 Tagen nachweisen (F). Dennoch findet sich trotz Wiedereröffnung des Lumens eine weiterhin vorhandene erhöhte Leukozyten-Endothelzell-Interaktion (K&L) in Verbindung mit einer gestörten Endothelintegrität.*

Die Beurteilung des Leukozyten Flux unter Ausgangsbedingungen in den untersuchten Venolen ergab keine statistischen Unterschiede zwischen Gefäßen, die nach 24 Stunden noch verschlossen ( $17.5 \pm 7.5 \text{ cells/30s}$ ) waren und denen, die sich wiedergeöffnet ( $18.7 \pm 5.2 \text{ cells/30s}$ ) hatten. Die erhobenen Mittelwerte des Leukozyten Flux nach 24 Stunden in den rekanalisierten Venolen ( $13.8 \pm 1.4 \text{ cells/30s}$ ) unterschieden sich nicht signifikant von den Ausgangswerten.

Allerdings konnte nach 24 Stunden eine erhöhte Leukozytenadhäsion in den wieder geöffneten Gefäßen nachgewiesen werden ( $2.00 \pm 0.77$  pro  $100\mu\text{m}$ ). Diese unterschied sich signifikant ( $p < 0.05$ ) von den erhobenen Ausgangswerten derselben Gefäße ( $0.50 \pm 0.27$  pro  $100\mu\text{m}$ ), wie auch von der „baseline“ der nach 24h noch okkludierten Venolen ( $0.50 \pm 0.27$  pro  $100\mu\text{m}$ ).

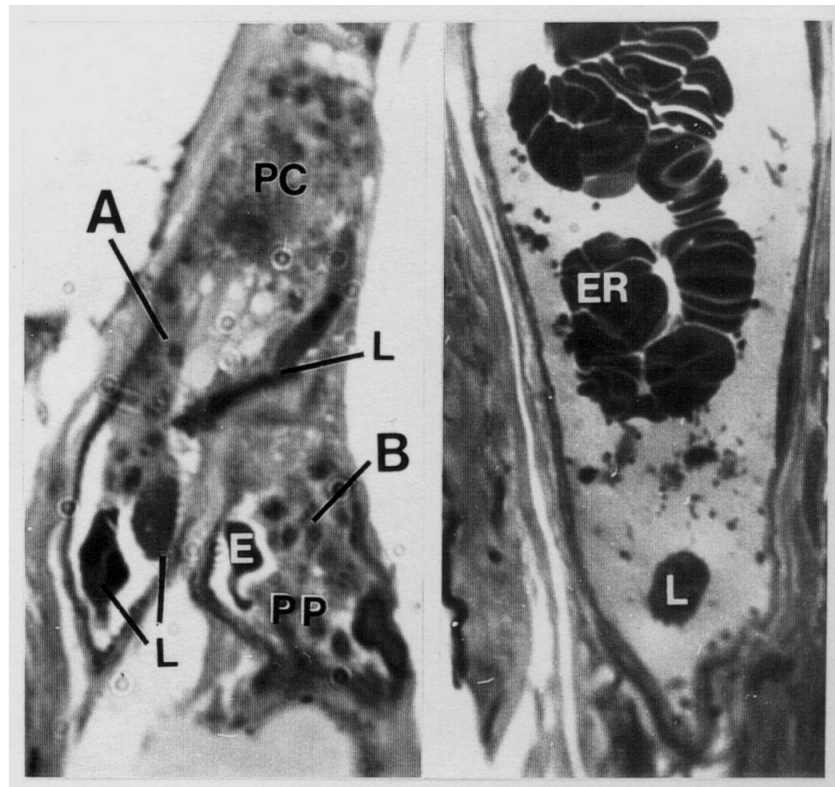
Selbst nach einer Zeitdauer von 7 Tagen konnte eine erhöhte Leukozytenadhäsion nachgewiesen werden (Abb. 16).

Demgegenüber fand sich zu keinem der Untersuchungszeitpunkte eine nachweisbare Leukozytenadhäsion in den untersuchten Arteriolen.



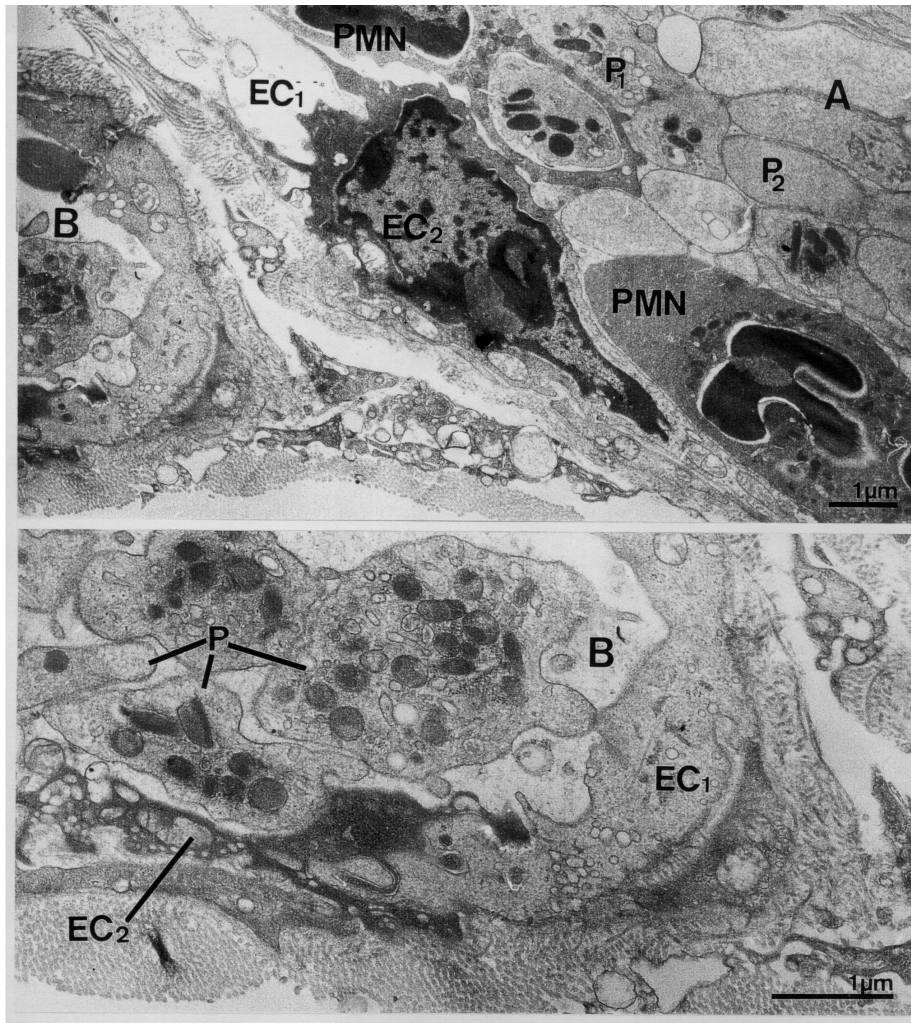
### **Ultrastrukturelle Auswertung**

Die histologische Auswertung der angefertigten Semidünnschnitte ließ erkennen, dass die entstandenen Gefäßthromben aus aggregierten Blutplättchen bzw. verklumpten Thrombozyten wie auch aus Granulozyten bestanden (Abb.17).



**Abb. 17:** Semidünnschnittpräparate. Links sieht man zwei schmale Blutgefäße, die der im Versuch induzierten photochemischen Reaktion ausgesetzt waren. Gefäß A ist gefüllt mit miteinander verklebten Blutplättchen (platelet clot, PC) und Granulozyten (L), welche gemeinsam mit dem umgebenden Endothel in Kontakt stehen. Gefäß B besteht maßgeblich aus einem hämostatischen Thrombus aus aggregierten Thrombozyten (PP) und vereinzelt Erythrozyten (E).

Auf der rechten Seite findet sich ein Blutgefäß aus der oberhalb des Thrombus gelegenen Region (upstream region). Die „upstream region“ des Thrombus ist mehrheitlich mit aufeinanderliegenden Erythrozyten (ER) und vereinzelt Leukozyten (L) gefüllt.



**Abb. 18:** Ultrastrukturelle Präparate der Blutgefäße A und B aus Abbildung 17, Darstellung links. Die Endothelzellen im Gefäß A weisen deutliche Veränderungen auf: Das Zytoplasma der Zelle EC<sub>1</sub> wirkt ausgewaschen, wohingegen das Zytoplasma in der Zelle EC<sub>2</sub> einen stark „eingedickten“ Eindruck macht. Darüber hinaus finden sich im linken Teil dieser Zelle Unterbrechungen des Kontaktes mit der Basallamina. Die Blutplättchen im Thrombus zeigen verschiedene Stadien der Degranulation (P<sub>1</sub> vs. P<sub>2</sub>) und befinden sich in engem Kontakt mit dem benachbarten Granulozyten (PMN). Dieser steht wiederum in direktem Kontakt mit dem umgebenden Endothel (EC).

Der untere Teil der Abbildung präsentiert das Gefäß B in einer stärkeren Vergrößerung. Es lassen sich aktivierte Thrombozyten (P) nachweisen, die in direktem Kontakt zum Gefäßwandendothel stehen (EC). Während die Endothelzelle EC<sub>1</sub> eine reguläre zytoplasmatische Struktur und Dichte aufweist, findet sich bei der Zelle EC<sub>2</sub> ein sehr dunkles Zytoplasma mit ungewöhnlichen Vakuolen. Insgesamt wirkt die Zelle geschrumpft.

Die Region oberhalb des Thrombus zeigt dicht gepackte Erythrozyten in einer typischen „rouleaux“ Formation (Abb. 17).

Die ultrastrukturelle Untersuchung der verschlossenen Blutgefäße kann einen deutlichen Endothelschaden nachweisen. Es lassen sich zum Einen Unterbrechungen in der Basallamina und zytoplasmatische Vakuolen nachweisen; zum Anderen finden sich ebenso Blutplättchen, in verschiedenen Stadien der Degranulation, die in engem Kontakt untereinander und mit benachbarten Leukozyten sowie dem umgebenden Gefäßwandendothel stehen (Abb 18).

### ***Wirkung von Heparin***

Die intravenöse Gabe von Heparin (300U/kg Körpergewicht) konnte in Venolen alle Phasen der Thrombusentstehung (erste Zellablagerung am Endothel, 50% Gefäßverschluss, komplette Okklusion) signifikant ( $p < 0.05$ ) verzögern (Abb. 19).

Auch in Arteriolen erbrachte die durchgeführte Heparin-gabe eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Verlängerung der Zeitspanne bis zur Ausbildung der ersten Zellablagerungen am Endothel (Abb. 19). Jedoch ließ sich in den Arteriolen nur eine leichte Verzögerung der Zeit bis zum 50%igen Verschluss bzw. bis zur kompletten Gefäßokklusion nachweisen (Abb. 19).

	Arteriolen		Venolen	
	Unbehandelt	Heparin	Unbehandelt	Heparin
<b>Erste Zellablagerungen</b>	139±13	<b>259±59*</b>	59±2	<b>190±14*</b>
<b>Gefäßverschluss zu 50%</b>	625±156	985±207	275±46	<b>720±166*</b>
<b>Vollständiger Gefäßverschluss</b>	1204±230	1463±335	449±78	<b>1267±454*</b>

**Abb. 19:** Tabellarische Aufstellung der Kinetik der Thrombusbildung in Arteriolen und Venolen am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr) bei unbehandelten Tieren (Unbehandelt) und bei mit Heparin (300U/kg Körpergewicht) behandelten Tieren (Heparin). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [s]; Student's t-Test: \* $p < 0.05$  vs. Unbehandelt.

Betrachtet man sich die Ergebnisse der Messungen nach 24 Stunden, zeigte sich in Venolen nach Heparin-gabe ein ähnliches Resultat wie in der unbehandelten Versuchsgruppe. 64% der Venolen in der behandelten Gruppe und 75% der venösen Gefäße der unbehandelten Tiere waren nach 24 Stunden wieder perfundiert.

Demgegenüber ergab die statistische Auswertung bei den Arteriolen eine signifikante ( $p < 0.05$ ) Verbesserung der Rekanalisation nach Gabe von Heparin. Während nur ein arterielles Gefäß (11%) in der unbehandelten Gruppe nach 24 Stunden wieder perfundiert war, führte die Gabe von Heparin zu Versuchsbeginn zu einer 100% Wiedereröffnungsrate.

Betrachtet man sich den durch das Thromboseereignis entstandenen Endothelschaden (Extravasation) so fanden sich keine signifikanten Unterschiede zwischen den Versuchsgruppen. Die Ausgangswerte in der HeparinGruppe betrugen  $0.32 \pm 0.03$  in Arteriolen und  $0.41 \pm 0.03$  in Venolen. Am stärksten ausgeprägt war der entstandene Endothelschaden sowohl in Arteriolen wie auch in Venolen in der frühen Phase der Thrombusentstehung. Aber auch nach 24 Stunden konnte eine vorhandene Endothelschädigung nachgewiesen werden.

Die Messungen (grey level [extravaskulär/intravaskulär]) des Endothelschadens erbrachten im Einzelnen folgende Ergebnisse:

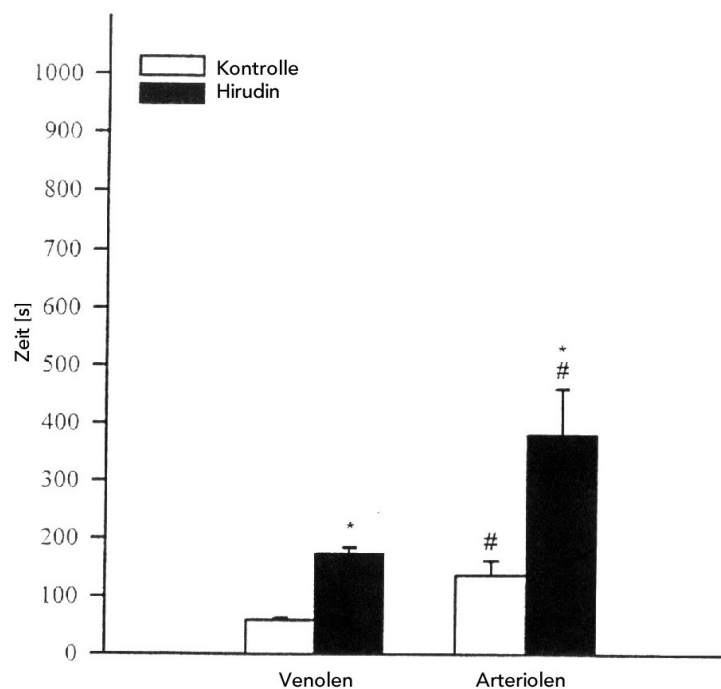
	Arteriolen	Venolen
5min	$0.64 \pm 0.06$	$0.80 \pm 0.04$
30min	$0.74 \pm 0.06$	$0.86 \pm 0.03$
24h	$0.68 \pm 0.08$	$0.57 \pm 0.05$

Der Vergleich der wall shear rate, wie auch das Auftreten von Vasomotion war in beiden Versuchsgruppen nahezu identisch. Auch bei der Betrachtung der Leukozyten – Endothelzell – Interaktion fand sich kein nennenswerter Unterschied zwischen unbehandelten Tieren und denen, die zu Beginn des Versuches Heparin erhalten hatten.

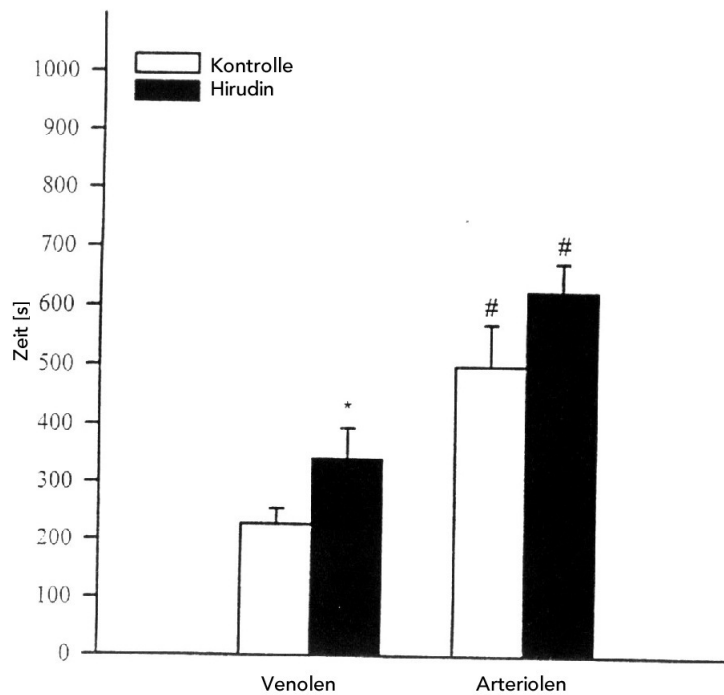
## **Wirkung von r-Hirudin HBW 023**

### *Thrombusbildung und vaskuläre Rekanalisation*

In Venolen resultierte die i.v. Applikation von r-Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) zu Versuchsbeginn in einer deutlichen Verlängerung der Zeitspanne bis zur Ablagerung der ersten Zellen am Endothel ( $173 \pm 11$ s) im Vergleich zu mit Kochsalzlösung (NaCl 0.9%) behandelten Kontrollen ( $59 \pm 4$ s,  $p < 0.05$ ) (Abb. 20). 50% des Innendurchmessers der untersuchten Venolen waren bei Gabe von r-Hirudin nach  $342 \pm 54$ s, in der Kontrollgruppe nach  $228 \pm 27$ s verlegt ( $p < 0.05$ ) (Abb. 21). Der komplette Gefäßverschluss konnte nach  $541 \pm 85$ s (r-Hirudin) bzw. nach  $344 \pm 43$ s (NaCl) beobachtet werden ( $p < 0.05$ ) (Abb. 22).



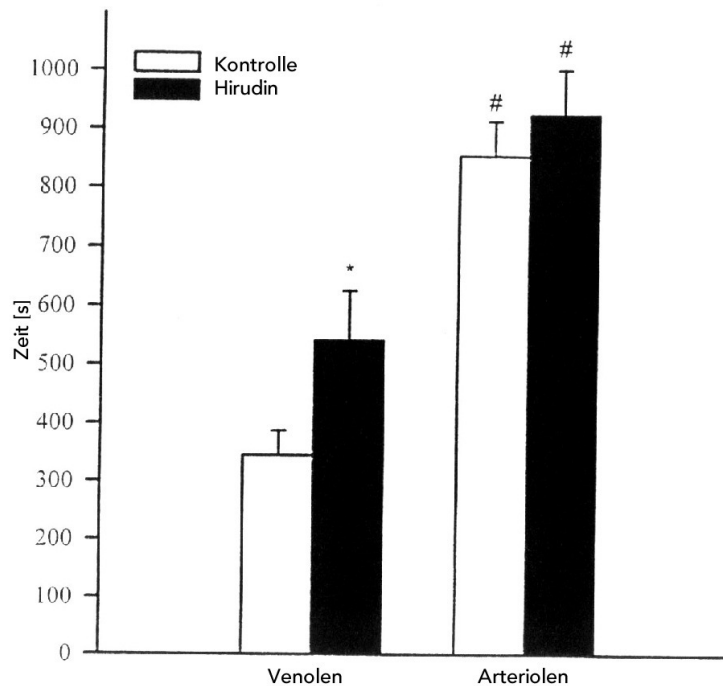
**Abb. 20:** Kinetik der Thrombusentstehung nach Gabe von Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) respektive Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) als Kontrolle: Erste Zellablagerungen am Gefäßendothel in Arteriolen und Venolen am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [s]. Student's t-Test: # $p < 0.05$  vs. Venolen, \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle.



**Abb. 21:** Kinetik der Thrombusentstehung nach Gabe von Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) respektive Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) als Kontrolle: Reduktion des inneren Gefäßdurchmessers auf 50% in Arteriolen und Venolen am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [s]. Student's t-Test: # $p < 0.05$  vs. Venolen, \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Die Untersuchung der Arteriolen zeigte ebenfalls eine signifikante Verzögerung ( $p < 0.05$ ) der Ausbildung erster Ablagerungen am Endothel unter der Wirkung von r-Hirudin ( $381 \pm 80$ s) im Vergleich zur Gruppe der mit Kochsalzlösung behandelten Tiere ( $137 \pm 25$ s) (Abb. 20).

Demgegenüber stand allerdings nur eine mäßige Verlängerung der Zeitspanne bis zur Reduktion des Lumens auf 50% unter Hirudingabe ( $627 \pm 49$ s vs.  $501 \pm 71$ s) (Abb. 21). Keinen Unterschied konnten wir feststellen bei der Dauer bis zur vollständigen Thrombosierung des Gefäßes ( $925 \pm 78$ s vs.  $854 \pm 60$ s) (Abb. 22).

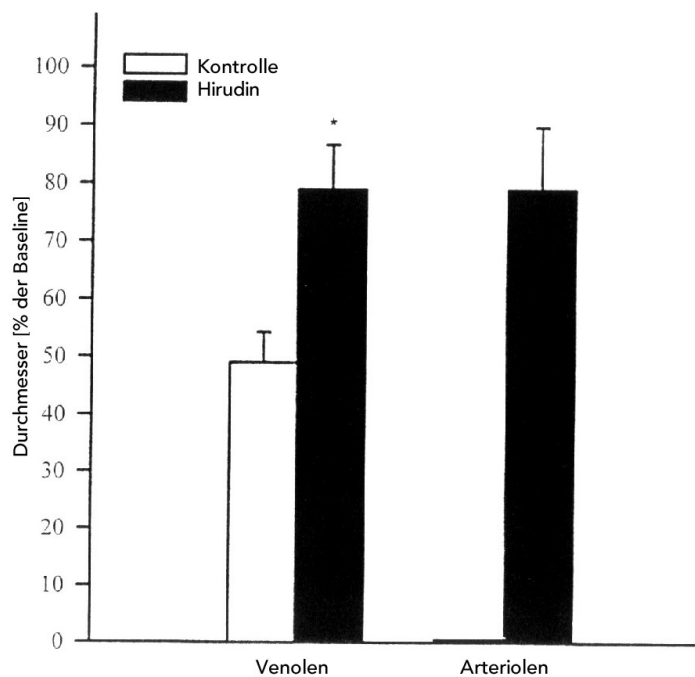
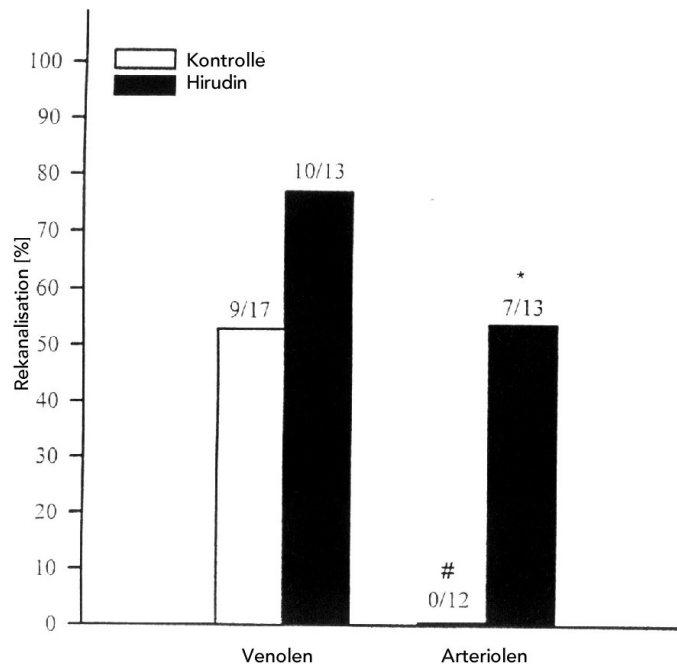


**Abb. 22:** Kinetik der Thrombusentstehung nach Gabe von Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) respektive Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) als Kontrolle: Komplette Gefäßokklusion in Arteriolen und Venolen am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [s]. Student's t-Test: # $p < 0.05$  vs. Venolen, \* $p < 0.05$  vs. Kontrolle.

Die Wiedereröffnung eines thrombosierten Gefäßes (Arteriolen und Venolen) konnte weder nach 5min noch nach 30min beobachtet werden. Im Gegensatz dazu führte die Applikation von Hirudin in Arteriolen ( $p < 0.05$ ) wie Venolen zu einer gesteigerten Gefäßrekanalisation nach 24 Stunden (Abb. 23).

Gleichzeitig bewirkte Hirudin auch eine Vergrößerung des inneren Gefäßdurchmessers in den rekanalisierten Venolen ( $79 \pm 7.7\%$  vs.  $49 \pm 5.3\%$  in der NaCl-Gruppe) (Abb. 24). Eine Aussage bezüglich des Verhaltens der Arteriolen war aufgrund der fehlenden Ereignisse in der Kontrollgruppe (keine Rekanalisation nach 24h) nicht möglich.





**Abb. 23 und 24:** Darstellung der Häufigkeit einer Gefäßrekanalisation 24 Stunden nach Thrombosierung (Abb. 23, oben) und den nach Rekanalisation gemessenen Gefäßinnendurchmessern (Abb. 24, unten) bei Gabe von Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) respektive Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) als Kontrolle. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM.  $\chi^2$ -Test: #  $p < 0.05$  vs. Venolen, \*  $p < 0.05$  vs. Kontrolle

## Mikrozirkulation

Betrachtet man sich die wall shear rate so finden sich keine Unterschiede zwischen den beiden Gruppen, sowohl zu Beginn des Experiments wie auch eine Minute vor Thrombosierung. Es zeigte sich aber erwartungsgemäß eine signifikante Verminderung der „wall shear rate“ kurz (1min) vor der völligen Okklusion der Gefäße (Abb. 25). Interessanterweise zeigten sich aber in der Hirudingruppe auch signifikante ( $p < 0.05$ ) Unterschiede in diesem Parameter nach 24 Stunden im Vergleich zum Ausgangswert (Venolen:  $55 \pm 11.7 \text{ s}^{-1}$  nach 24h vs.  $121 \pm 23.7 \text{ s}^{-1}$  baseline) und auch im Vergleich zur Kontrollgruppe (Venolen:  $55 \pm 11.7 \text{ s}^{-1}$  nach 24h vs.  $117 \pm 24.8 \text{ s}^{-1}$  in der NaCl-gruppe).

	Arteriolen		Venolen	
	r-Hirudin	Kontrolle (NaCl)	r-Hirudin	Kontrolle (NaCl)
<b>Baseline</b>	$378 \pm 73.3$	$272 \pm 43.2$	$121 \pm 23.7$	$127 \pm 24.9$
<b>Okklusion -1min</b>	<b><math>99 \pm 21.6^*</math></b>	<b><math>71 \pm 12.9^*</math></b>	<b><math>29 \pm 4.1^*</math></b>	<b><math>49 \pm 11.3^*</math></b>

**Abb. 25:** Wall shear rate zu Beginn des Versuchs und 1min vor Thrombosierung in Arteriolen und Venolen nach Applikation von Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) respektive Kochsalzlösung (NaCl 0,9%) als Kontrolle. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte  $\pm$  SEM [ $\text{s}^{-1}$ ]; Student's t-Test:  $*p < 0.05$  vs. baseline.

Der bei Induktion der Thrombose entstandene Endothelschaden (= Verlust der Integrität des Endothels) verstärkte sich in beiden Gruppen signifikant im Verlauf der frühen Phase nach Gefäßokklusion (5min, 30min) und war auch nach 24h weiterhin nachweisbar. Ein Unterschied zwischen den Gruppen konnte hier nicht nachgewiesen werden (Abb. 26)

Vasomotion zeigte sich lediglich in Arteriolen. Unter Ausgangsbedingungen war das Auftreten von Vasomotion in beiden Gruppen ähnlich (r-Hirudin: 31% [4/13]; NaCl: 25% [3/12]), wohingegen, eine Minute vor vollständiger Okkulsion der Arteriolen, in der Gruppe der mit

Kochsalzlösung behandelten Tiere (=Kontrolle) deutlich gehäuft das Phänomen der Vasomotion zu beobachten war (15% [2/13] r-Hirudin vs. 83% [10/12] Kontrolle).

	Arteriolen		Venolen	
	r-Hirudin	Kontrolle	r-Hirudin	Kontrolle
<b>Baseline</b>	0.50±0.03	0.52±0.09	0.53±0.05	0.49±0.11
<b>-1min</b>	0.52±0.12	0.43±0.05.3	0.56±0.14	0.39±0.07
<b>Okklusion</b>	0.49±0.06	0.34±0.11	0.55±0.10	0.44±0.12
<b>5min</b>	<b>0.91±0.03*</b>	<b>0.96±0.17*</b>	<b>0.89±0.11*</b>	<b>0.91±0.09*</b>
<b>30min</b>	<b>1.02±0.05*</b>	<b>0.97±0.06*</b>	<b>1.02±0.08*</b>	<b>0.94±0.04*</b>
<b>24h</b>	<b>0.73±0.06*</b>	<b>0.86±0.08*</b>	0.66±0.11	0.64±0.10

**Abb. 25:** Störung der Endothelintegrität in Arteriolen und Venolen nach erfolgreicher Thrombosierung in mit r-Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) behandelten Tieren und Tieren, die NaCl- Lösung 0,9% erhalten hatten (=Kontrolle). Die dargestellten Zeitpunkte umfassen den kompletten Untersuchungszeitraum vom Beginn des Experiments (=Baseline) über die Zeitpunkte 1min vor Thrombosierung (-1min), Zeitpunkt der kompletten Gefäß-thrombosierung (Okklusion), 5min bzw. 30min nach Thrombusbildung bis zur letzten Messung nach 24h. Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM. One way ANOVA, Student's T-Test mit Korrektur nach Bonferroni Holm: \* $p < 0.05$  vs. baseline. Ein Vergleich zwischen den Gruppen ergab keine signifikanten Unterschiede.

### *Inflammatorische Antwort*

Die Untersuchung des Leukozyten-Flux in Venolen ergab zu allen Zeitpunkten ähnliche Resultate in beiden Gruppen. Darüber hinaus ließen sich auch keine Unterschiede bei der Betrachtung der Ausgangswerte nachweisen, zwischen Gefäßen, die nach 24h wieder perfundiert waren und denen, die weiterhin vom Thrombus verschlossen waren (Abb. 26). Auch der Vergleich des Leukozyten-Flux zwischen „baseline“ und 24h nach Thrombosierung in wieder eröffneten Gefäßen zeigte keine signifikanten Veränderungen (Abb. 26).

Venolen	verschlossen nach 24h		perfundiert nach 24h	
	Hirudin	Kontrolle	Hirudin	Kontrolle
<b>Baseline</b>	9.3±2.2	14.4±6.8	11.1±2.4	15.7±5.6
<b>24h</b>			8.2±1.7	12.2±2.4

**Abb. 25:** Leukozyten-Flux (Zellen/30s) zu Beginn des Experiments (Baseline) und 24h nach Induktion des Thrombus. Dargestellt sind sowohl die rekanalisierten als auch die nach 24h noch okkludierten Venolen in mit r-Hirudin (1mg/kg Körpergewicht) behandelten Tieren und Tieren, die NaCl - Lösung 0,9% erhalten haben (=Kontrolle). Die Werte sind dargestellt als Mittelwerte ± SEM.

Auch das Auftreten von Leukozytenadhäsion am Endothel war in den Untersuchungsgruppen nicht signifikant unterschiedlich. Demgegenüber fanden sich aber signifikante ( $p < 0.05$ ) Veränderungen in beiden Gruppen bei der Betrachtung der Leukozyten – Endothelzell – Interaktion in wieder perfundierten Venolen (24h) im Vergleich zum Ausgangswert (\*):

Venolen	Hirudin	Kontrolle
Baseline	1.0±0.7 /100µm	0.33±0.2 /100µm
24h nach Okklusion	4.2±1.0 /100µm*	2.5±0.3 /100µm*

In wieder perfundierten Arteriolen (nur mit Hirudin behandelte Tiere nach 24h) wiesen wir ebenfalls das vermehrte Auftreten von Leukozytenadhäsion ( $4.0 \pm 0.5$  /100 $\mu\text{m}$ ) nach, vergleichbar den Ergebnissen wie wir sie in Venolen beobachtet haben. Die Auswertung der Ergebnisse unter Ausgangsbedingungen konnte in beiden Gruppen keine Leukotytenadhäsion in Arteriolen nachweisen.

## **Diskussion**

### ***Etablierung und Validierung des Modells***

Aufgrund der klinisch hohen Bedeutung der Prophylaxe und erfolgreichen Therapie von Thromboseerkrankungen wurden experimentelle in vitro, wie auch in vivo Modelle entwickelt um einerseits die komplexe Ätiologie und Pathogenese (ARONSON et al., DODDS, GRALNICK et al., PIOTROWICZ et al.) andererseits die Effektivität unterschiedlicher Wirkstoffe in der Vorbeugung (FAREED et al., YOKOTA et al.) und Behandlung (CHEN et al., YAO et al.) der Thrombose zu erforschen.

Das Ziel dieser Studie war es, ein neues experimentelles Modell zu etablieren, um damit die vielseitigen Möglichkeiten der intravitalen Mikroskopie für die Erforschung der Pathophysiologie und die Behandlung der Thromboseerkrankung nutzbar zu machen. Die intravitale Mikroskopie repräsentiert eine ideale Methode für die direkte Beobachtung mikrohämodynamischer Veränderungen und zellulärer Interaktionen gerade auch im Hinblick auf die Entstehung von Gefäßthromben. Somit ist es auf diese Weise möglich die vielschichtige Pathophysiologie der Thromboseentstehung, wie auch die Wirkungsweise von neuen Therapieansätzen zu untersuchen und besser zu verstehen.

Nur wenige der bisher etablierten Modelle erlauben eine direkte Betrachtung der Thrombusbildung (JOURDAN et al., LAUX et al., WEICHERT et al.) bzw. lassen eine Beurteilung der Rekanalisation thrombosierter Gefäße zu (HANSON et al., ROTE et al.). Obgleich es möglich ist, anhand dieser Modelle bestimmte Teilaspekte der Thrombusentstehung oder der Rekanalisation zu untersuchen, ist keines der etablierten Modelle in der Lage in vivo den gesamten Ablauf der Thrombusbildung vom ersten Endothelschaden bis zum vollständigen Verschluss und einer möglichen Rekanalisation an ein und demselben Blutgefäß zu evaluieren.

Demgegenüber erlaubt das hier vorgestellte Modell eine direkte Beobachtung des vollständigen Prozesses der Ausbildung eines Gefäßthrombus, wie auch eine mögliche Rekanalisation sowohl in der arteriellen als auch in der venösen Strombahn. Der größte Vorteil des beschriebenen experimentellen in vivo Modells besteht jedoch in seiner Einfachheit. Aufgrund der natürlichen anatomischen Gegebenheiten am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr) kann auf jegliche chirurgische Intervention verzichtet werden. Somit kann, im Gegensatz zu anderen Modellen, eine mögliche Beeinflussung der Ergebnisse durch

präparationsbedingte chirurgische Intervention mit der Folge von Veränderungen der lokalen oder systemischen Hämodynamik oder der körpereigenen Immunantwort (Vasokonstriktion, Freisetzung von Mediatoren, etc.) ausgeschlossen werden. Darüber hinaus bietet der beschriebene experimentelle Aufbau die Gelegenheit am Ohr der haarlosen Maus auf simple Weise in vivo an identischen Mikrogefäßen wiederholt über Tage und Monate Messungen durchzuführen, um so auch Langzeitveränderungen zu beobachten und auswerten zu können. Zudem reduziert die Chance der wiederholten Analyse identischer Blutgefäße während des gesamten Experiments einen durch intraindividuelle biologische Heterogenität bedingten statistischen Fehler auf ein Minimum.

Die Ausbildung eines Thrombus wird in diesem Modell durch eine photochemische Reaktion hervorgerufen. Hierbei wurde als photoreaktive Substanz Fluoreszein – Isothiozyanat (FITC-Dextran, MW150.000) verwendet, welches bei transdermaler Blaulichtexposition (Exzitationswellenlänge 450-490nm) eine phototoxisch – bedingte Schädigung des Gefäßendothels erzeugt. Ausgelöst wird dieser Schaden durch die Entstehung reaktiver freier Sauerstoffradikale, die im Zuge des Energietransfers vom durch Lichtenergie angeregtem Farbstoff zu Sauerstoff entstehen (SANIABADI et al.). Die von uns durchgeführten elektronenmikroskopischen Untersuchungen untermauern dies. Der erzeugte Endothelschaden ist charakterisiert durch die Bildung einer Vielzahl von Vakuolen im Zytoplasma, einen markanten Zellmembranschaden und einer Reihe von Unterbrechungen des direkten Kontaktes zwischen Endothel und Basallamina. Diese Befunde stehen auch in Einklang mit den Untersuchungen von SANIABADI und Mitarbeitern, die ebenfalls in histologischen Untersuchungen eine starke Beeinträchtigung der Integrität der Endothelzelle nach photochemischer Gefäßwandschädigung belegen konnten. Als Folge dieser Schädigung binden erste Blutzellen gefolgt von Blutplättchen an der verletzten Gefäßwand und führen so unwiderruflich zur langsamen Ausbildung eines das vollständige Lumen verlegenden Thrombus (HERRMANN, SANIABADI et al.).

In Übereinstimmung mit anderen Studien kann im hier vorgestellten experimentellen Thrombosemodell in einem vergleichbaren Zeitraum die Ausbildung eines Thrombus hervorgerufen werden (LAUX et al., SIEGEL et al.). Ebenso zeigt unser Versuchsaufbau eine anderen Untersuchungen entsprechende Reaktion bezüglich Lichtexposition bzw. damit ausgelöstem Endothelzellschaden (LAUX et al.). Dies umfasst das Auftreten von Vasomation (besonders eindrucksvoll in Arteriolen, LAUX et al.), die Abnahme der Wandscherrate (wall

shear rate) während der Ausbildung des Thrombus (SIEGEL et al.), die Beschädigung der Integrität des Endothels (PERRY et al.) wie auch die gesteigerte Adhäsion von weißen Blutzellen und Blutplättchen an der Gefäßwand (BELCH).

In Übereinstimmung mit Untersuchungen anderer Arbeitsgruppen (ROSENBLUM, SANIABADI et al.) zeigte sich auch im vorgestellten experimentellen Modell eine signifikant verzögerte Thrombusbildung in Arteriolen im Vergleich zu Venolen. Die Ursache dafür liegt wohl am ehesten in der in Arteriolen deutlich erhöhten Fließgeschwindigkeit (wall shear rate) begründet. Darüber hinaus gilt es als erwiesen, dass Arteriolen im Vergleich zu Venolen unterschiedlich auf die von uns zur Provokation eines Gefäßverschlusses eingesetzte photochemische Thrombusinduktionstechnik reagieren. Diese Annahme stützt sich auf die Studien von SATO und Mitarbeitern im Rattenmodell, die nachweisen konnten, dass bei identischer Wandscherrate das Zustandekommen einer initialen Plättchenaggregation an der Gefäßwand in Arteriolen im Vergleich zu Venolen deutlich verzögert ist (SATO et al.). Als Erklärung für dieses Verhalten gehen Sato et al. davon aus, dass funktionelle Charakteristika der arteriolen Endothelzelle sich von den Gegebenheiten wie man sie in Venolen findet unterscheiden. Ein endgültiger Beweis ob und inwieweit sich eine durch photochemische Reaktion entstandene Endothelschädigung in Arteriolen von der in Venolen unterscheidet ist jedoch noch nicht erbracht. Allerdings gibt es Hinweise darauf, dass unterschiedliche zelluläre Protektionsmechanismen oder verschiedene anti- bzw. pro-aggregatorische Wirkstoffe von Endothelzellen in Venolen im Vergleich zu Arteriolen bei drohendem Verlust der Gefäßintegrität freigesetzt werden (ROSENBLUM). Eine weitere Erklärung für das offensichtlich differente Verhalten könnte aber auch das Vorhandensein einer vermehrten Vasomotion in Arteriolen sein, welches sich in Venolen nicht nachweisen ließ. Dieser zusätzliche für Arteriolen spezifische Abwehrmechanismus, wie wir ihn in der vorliegenden Untersuchung nachgewiesen haben, könnte somit als ein weiterer Mosaikstein für eine Hypothese dienen, welche die nachweislich verzögerte Thrombusbildung in arteriolen Mikrogefäßen erklärt.

Das Fortbestehen einer gesteigerten Leukozytenadhäsion an der Gefäßwand nach erfolgter Rekanalisation (nach 24h) konnte lediglich in Venolen beobachtet werden. Dennoch konnte in Venolen und Arteriolen der photoreaktiv - induzierte Endothelschaden (ursächlich für die Bildung des Thrombus) zum oben genannten Zeitpunkt weiterhin, in ähnlicher Ausprägung,



nachgewiesen werden (Extravasation von FITC-Dextran). Eine mögliche Erklärung für das ausnahmslose Vorhandensein dieser Leukozyten – Endothelzell – Interaktionen in den untersuchten Venolen dürfte der deutliche Unterschied in der in den Mikrogefäßen vorhandenen Fließgeschwindigkeiten sein. Betrachtet man sich die Situation in den Venolen isoliert, so ist es wahrscheinlich, dass nicht alleine die veränderte Mikrohämodynamik dafür verantwortlich ist, sondern wohl auch eine inflammatorische Reaktion des Gewebes. Als Beleg hierfür dienen die Ergebnisse der Untersuchung der „wall shear rate“. So zeigt sich ein erhöhtes Adhäsionsverhalten der Leukozyten in rekanalisierten Venolen, obgleich die mikrohämodynamischen Bedingungen sich nicht deutlich von denen unter Ausgangsbedingungen unterscheiden. Inwieweit die photochemische Reaktion bei der Thrombusentstehung für diese inflammatorische Gewebereaktion ursächlich ist, oder ob vielmehr der entstandene Ischämie – Reperfusionsschaden maßgeblichen Anteil daran hat gilt es noch zu klären.

Betrachtet man sich die Häufigkeit der erfolgreichen Rekanalisation in Venolen im Vergleich zu Arteriolen, so zeigt sich eine signifikante Häufung in den venulären Mikrogefäßen. Eine mögliche Erklärung hierfür könnte, neben der längeren Dauer der Lichtexposition, das unterschiedliche morphologische Verhalten (ROSENBLUM, SATO et al.) der Mikrogefäße, wie auch ihre ungleiche Gefäßarchitektur und Funktion sein.

Zur Validierung unseres experimentellen Ansatzes am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr) untersuchten wir die antithrombotische Wirkung von Heparin in diesem Modell. Hierzu verwendeten wir eine Dosierung, die sich bereits in früheren Studien an Tiermodellen als effektiv erwiesen hat (SUGIDACHI et al., BERNAT et al.). Sowohl im Vergleich zu den Resultaten bei Elektrostimulation zur Thrombusinduktion im Kaninchenmodell (SUGIDACHI et al.), als auch zu den Ergebnissen in einem Stase-induzierten Thrombosemodell an Mäusen (BERNAT et al.) lieferte unser Modell der photochemisch induzierten Gefäßthrombosierung eine ähnliche Effektivität der durchgeführten Heparinapplikation. Somit konnte der Beweis erbracht werden, dass unser Modell für die Untersuchung therapeutischer Therapieansätze bei der Behandlung von Thrombosen geeignet ist.

Wie in den bereits erwähnten Studien konnten auch wir eine erfolgreiche Verzögerung der Thrombusentstehung durch Gabe von Heparin nachweisen. Allerdings hatte die durchgeführte Heparinbehandlung keine Auswirkung auf das Entstehen einer auftretenden Endothelzellschädigung mit nachfolgender Störung der Integrität der Gefäßwand durch den

lichtinduzierten photochemischen Zellschaden. Dies lässt am ehesten den Schluss zu, dass Heparin keine Schutzwirkung gegen diese Art der Endothelzellschädigung besitzt.

Unsere Studienergebnisse im Zusammenhang betrachtet können wir somit folgendes feststellen: Das hier vorgestellte neue experimentelle in vivo Modell am Ohr der haarlosen Maus (hr/hr) eignet sich für die intravitalmikroskopische Untersuchung aller Phasen der Thrombusentstehung, wie auch der Rekanalisation von Mikrogefäßen der arteriolären und venulären Strombahn. Darüber hinaus konnte es seine Validität sowohl in der, in dieser Studie durchgeführten Wirkstoffeffizienzanalyse an Heparin, wie auch in weiterführenden Studien unserer eigenen und auch fremder Arbeitsgruppen nachweisen (AGERO et al., PROSKE et al.).

Somit konnten wir nachweisen, dass unser hier vorgestelltes experimentelles Tiermodell für die Evaluation der Wirkungsmechanismen neuer antithrombotischer Wirkstoffe geeignet ist und auch in der Entwicklung neuer Thrombolyseverfahren einen wertvollen Beitrag leisten kann.

### ***Wirkung von Hirudin (HBW 023)***

Bis zur Entdeckung von Heparin durch Jay McLean im Jahre 1916 war Hirudin, ein Bestandteil des Speichelsekretes des Blutegels, die einzige Substanz die in der Lage war das Gerinnen von Blut zu verhindern. Nach der ersten erfolgreichen Gewinnung von Hirudin aus Blutegelsextrakt durch YACOBI im Jahre 1904, war es der französische Chirurg Termier, der Hirudin in den 1920er Jahren in die klinische Praxis einführte. Nach der Etablierung von Heparin in der Medizin Ende der 1930er Jahre spielte Hirudin aufgrund seiner nicht in großer Menge möglichen, sehr aufwendigen Herstellung aus gezüchteten Blutegeln in der klinischen Routine nur eine sehr untergeordnete Rolle. Erst mit der Möglichkeit der gentechnischen Herstellung von Hirudin in den späten 1980er Jahren erlebte die seit der Antike in der Heilkunst angewandte Substanz ihre Renaissance in der modernen Medizin. So wurden in den letzten 20 Jahren intensive Bemühungen unternommen, die neuen rekombinanten Hirudine in Studien zu untersuchen und auf ihre Einsatzmöglichkeiten in unterschiedlichen Bereichen der Medizin zu testen (GREINACHER et al., MARKWARDT 1955, MARKWARDT 1994, WALLIS et. al.).

Hirudin verfügt über eine sehr starke und spezifische Affinität zu Thrombin. Durch die irreversible Bindung an die Fibrinogenbindestelle von Thrombin (F-IIa) verschließt es mit einem Teil des Moleküls das aktive Zentrum des Thrombins, wodurch dessen Wirkung blockiert wird (direkter Thrombinantagonist) (WALLIS et al.). Selbst bei einer, bereits erfolgten Bindung von Thrombin an einen frischen Thrombus kann Hirudin das Enzym blockieren und zudem die weitere Ablagerung von Thrombin in einem frischen Blutgerinnsel reduzieren (BADIMON et al., RUBENS et al.). Neben seiner Fähigkeit die thrombininduzierte Blutgerinnung zu verhindern, ist es auch in der Lage, die Anheftung von Thrombozyten an eine geschädigte Gefäßwand zu vermindern (BADIMON et al.) und die vasokonstriktive Wirkung von Thrombin in deendothelialisierten Gefäßen zu blockieren (GLUSA et al.). Darüber hinaus inhibiert es verschiedene spezifische Kofaktoren der Gerinnungskaskade (V, VIII, Xa) (FRIEDBERG et al., LINDHOUT et al.) und blockiert die Freisetzung von Thromboxan (TXA<sub>2</sub>), Plättchenfaktor 4, Plasminogenaktivatorinhibitor Typ 1 (PAI1) sowie die Expression gerinnungsfördernder Phospholipide auf Thrombozyten, die eine entscheidende Rolle bei der Ausbildung eines frischen Thrombus spielen (KOIKE et al.). Interessanterweise wirken diese Inhibitionsmechanismen über den Zeitpunkt der Hirudin – Plasmaclearance hinaus (AGNELLI et al.). Die Erklärung hierfür ist mit hoher Wahrscheinlichkeit die starke Bindung von r-Hirudin an bereits im Thrombus gebundenes Thrombin und die damit

verbundene, nicht mit dem messbaren Plasmaspiegel übereinstimmende verlängerte Wirkdauer (KOUZ et al., SHEFFIELD et al.).

Hirudin ist, unabhängig von seiner Wirkung als hochpotentes Antikoagulans, gut verträglich, nebenwirkungsarm und pharmakodynamisch inert (CLOSE et al., HARENBERG et al., KROLICK, SPEIDL et al., VERSTRAETE et al.). Seine Halbwertszeit liegt zwischen 40 Minuten und 2 Stunden (HAINES et al., SPEIDL et al.). Die Ausscheidung erfolgt in unveränderter Form maßgeblich über die Niere (HAINES et al.).

Um nun der Frage nachzugehen inwieweit Hirudinpräparate geeignet sind, das Entstehen von Thrombosen nach feinchirurgischen Eingriffen zu verhindern, untersuchten wir die Wirkung von r-Hirudin (HBW 023) auf die Thrombusentstehung und Rekanalisation in unserem Modell am Ohr der haarlosen Maus.

Die Vorbehandlung mit r-Hirudin (1mg/kg Körpergewicht, i.v.) führte zu einer signifikanten Verzögerung der initialen Ablagerung von Blutzellen am Gefäßendothel in Arteriolen und Venolen. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit den Daten der Arbeitsgruppe um JUST, die ihre Untersuchungen an einem tierexperimentellen Modell der laserinduzierten Thrombose an Mesenterialgefäßen durchführten. Über diese Befunde hinaus konnten wir in vivo aufzeigen, dass r-Hirudin in Venolen alle Phasen der Thrombusentstehung signifikant verzögert und in Arteriolen zumindest eine tendenzielle Verlängerung bewirkt. Eine mögliche Erklärung hierfür könnten die Ergebnisse von SATO und Ohshima liefern, die davon ausgehen, dass sich die Endothelzellen von Arteriolen und Venolen unterscheiden. Diese Hypothese wird auch durch die Untersuchungen von ROSENBLUM unterstützt. So fand er Hinweise darauf, dass von Endothelzellen in Venolen im Vergleich zu Arteriolen, bei drohendem Verlust der Gefäßintegrität, unterschiedliche zelluläre Protektionsmechanismen ausgelöst werden.

Neben der erfolgreichen Verzögerung der Thrombusentstehung, bewirkte die Vorbehandlung mit r-Hirudin auch eine signifikante Zunahme der Rekanalisation zuvor verschlossener Mikrogefäße. Dies deckt sich mit verschiedenen in vitro Studien, die, unter Anwesenheit von Hirudin, eine deutlich verstärkte Fibrinolyse nachweisen konnten. Man geht davon aus, dass Hirudin bzw. Hirudin – Thrombin – Komplexe die Fibrinbildung behindern und damit die Festigkeit des entstehenden Thrombus verringern (BOOSTER et al., ELECTRICWALA et al., JUST et al., PORTER et al.).

Die Applikation von r-Hirudin hatte keine Auswirkungen auf die Wandscherrate während der Gefäßokklusion. Allerdings führte die Vorbehandlung mit Hirudin zu einer Verminderung derselben in rekanalisierten Venolen im Vergleich zur Kontrollgruppe. Eine mögliche Erklärung für dieses Phänomen könnte der größere Innendurchmesser in rekanalisierten Venolen bei Vorbehandlung mit Hirudin sein. Dieser führt zwangsläufig zu einer Verlangsamung der Erythrozytengeschwindigkeit und somit auch, basierend auf der verwendeten Formel zur Berechnung, zu einer Abnahme der Wandscherrate. Es ist durchaus vorstellbar, dass dieser Effekt von Hirudin einen generellen Einfluss auf die Wahrscheinlichkeit der Entstehung von Re-Thrombosen hat und einen weiteren Hirudin-typischen Protektionsmechanismus darstellt.

Der Gefäßschaden (=Verlust der Integrität der Gefäßwand) durch die in unserem Modell angewandte photochemische Reaktion ist in den von uns untersuchten Gruppen identisch. Daraus lässt sich folgern, dass r-Hirudin keinen Effekt auf die hier eingesetzte Technik der Thrombusinduktion hat, sondern vielmehr den eigentlichen Prozess der Entstehung des Gefäßthrombus verzögert.

In Übereinstimmung mit den bei der Etablierung des Modells gewonnenen Ergebnissen im ersten Teil der vorliegenden Arbeit konnte auch bei der Gabe von NaCl (=Kontrollgruppe) ein vermehrtes Auftreten von Vasomotion unmittelbar (-1min) vor Okklusion der Arteriolen beobachtet werden. Wie bereits ausgeführt (siehe Diskussion des Modells) halten wir es für möglich, dass Vasomotion zu einem der vielfältigen Protektionsmechanismen von Arteriolen gehört, die durch einen entstehenden Endothelschaden aktiviert werden. Das Ausbleiben von Vasomotion nach Vorbehandlung mit Hirudin ist aller Wahrscheinlichkeit nach vergesellschaftet mit der inhibitorischen Wirkung von Hirudin auf die Retraktionsfähigkeit von glatten Muskelzellen (GRECO et al.) und könnte damit auch eine mögliche Erklärung für die abgeschwächte Wirksamkeit von Hirudin bei der Thrombusentstehung in Arteriolen im Vergleich zu Venolen in unserem Modell sein.

Leukozyten-Flux wie auch die Adhäsion von Leukozyten an der Gefäßwand unterschieden sich in den Versuchsgruppen zu keinem Untersuchungszeitpunkt. In beiden Gruppen konnten wir aber in rekanalisierten Mikrogefäßen eine erhöhte Leukozytenadhärenz nachweisen. Diese vermehrt auftretenden Leukozyten – Endothelzell – Interaktionen lassen sich durch Veränderungen in der lokalen Mikrozirkulation (wall shear rate) (PERRY et al.) und als Antwort auf den vorliegenden Endothelzellschaden an der Gefäßwand erklären, wie bereits

von MAYROVITZ et al. anhand von intravitalmikroskopischen Studien zeigen konnte. Obgleich das Auftreten von Leukozytenadhäsion in der arteriellen Strombahn zunächst ungewöhnlich erscheint, spiegelt es aber wahrscheinlich lediglich die erhöhte Konzentration von freien Radikalen wieder, die bei der photochemischen Thrombusinduktion entstehen. Diese Sichtweise deckt sich auch mit Untersuchungen von BOOSTER et al. die in einem Ischämie-Reperfusionsmodell ebenfalls eine durch freie Radikale ausgelöste erhöhte Leukozytenadhäsion in Arteriolen nachweisen konnte.

Zusammenfassend betrachtet konnten wir in unserem Modell eine Verzögerung der Thrombusentstehung (=Thrombusprophylaxe) und eine Verbesserung der Rekanalisation (=Thrombolyse) von Mikrogefäßen nach Vorbehandlung mit r-Hirudin (HBW 023) nachweisen. Damit stehen unsere Ergebnisse im Einklang mit anderen Forschungsgruppen (BICHLER et. Al, GREINACHER et al., JOHNSON PC et al., JOHNSON PH et al., MO et al., MUREEBE) und untermauern seine Bedeutung als wertvolles Antikoagulans nicht nur im Bereich der Mikrochirurgie, sondern auch als wertvolles Hilfsmittel für die Prophylaxe und Therapie von Thrombosen und Embolien.

## Literaturverzeichnis

AGERO U, ARANTES RM, LACERDA-QUEIROZ N, MESQUITA ON, MAGALHÃES A, SANCHEZ EF, CARVALHO-TAVARES J.

Effect of mutalysin II on vascular recanalization after thrombosis induction in the ear of the hairless mice model.

Toxicon. 2007; 50(5):698-706.

AGNELLI G, RENGÀ C, WEITZ JI, NENCI GG, HIRSH J.

Sustained antithrombotic activity of hirudin after its plasma clearance: comparison with heparin.

Blood. 1992; 80(4):960-5.

AKTORIES K, FÖRSTERMANN U, HOFMANN FB, STARKE K.

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie.

Urban & Fischer Verlag, Deutschland. 2004

ARONSON DL, THOMAS DP.

Experimental studies on venous thrombosis: effect of coagulants, procoagulants and vessel contusion.

Thromb Haemost. 1985; 17;54(4):866-70.

BADIMON L, BADIMON JJ, LASSILA R, HERAS M, CHESEBRO JH, FUSTER V.

Thrombin regulation of platelet interaction with damaged vessel wall and isolated collagen type I at arterial flow conditions in a porcine model: effects of hirudins, heparin, and calcium chelation.

Blood. 1991; 78(2):423-34.

BAKER M, WAYLAND H.

On-line volume flow rate and velocity profile measurement for blood in microvessels.

Microvasc Res. 1974; 7(1):131-43.

BARKER JH, HAMMERSEN F, BONDAR I, UHL E, GALLA TJ, MENDER MD, MESSMER K.

The hairless mouse ear for in vivo studies of skin microcirculation.

Plast Reconstr Surg. 1989/1; 83(6):948-59.

BARKER JH, HAMMERSEN F, BONDAR I, UHL E, GALLA TJ, MENDER MD, GROSS W,  
MESSMER K

Direct monitoring of nutritive blood flow in a failing skin flap: the hairless mouse ear skin-flap model.

Plast Reconstr Surg. 1989/2; 84: 303-313.

BELCH JJ.

The role of the white blood cell in arterial disease.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1990; 1(2):183-91.

BERGENTZ SE.

What is new in the prophylaxis and treatment of venous thromboembolism?

World J Surg. 1996; 20(9):1141-8.

BERNAT A, LALE A, HERBERT JM.

Aurin tricarboxylic acid inhibits experimental venous thrombosis.

Thromb Res. 1994; 15;74(6):617-27.



BICHLER J, FRITZ H.

Hirudin, a new therapeutic tool?

Ann Hematol. 1991; 63(2):67-76.

BODARY PF, EITZMAN DT.

Animal models of thrombosis.

Curr Opin Hematol. 2009; 16(5):342-6.

BONDAR I, UHL E, BARKER JH, GALLA TJ, HAMMERSEN F, MESSMER K

A new model for studying microcirculatory changes during dermal wound healing.

Res Exp Med Berl 191: 379-388, 1991.

BOYKIN JV, ERIKSSON E, PITTMAN RN.

In vivo microcirculation of a scald burn and the progression of postburn dermal ischemia.

Plast Reconstr Surg 66: 191-198, 1980.

BOOSTER M, YIN M, KURVERS HA, TANGELDER GJ, WIJNEN RM, BUURMAN WA, HEINEMAN E, STUBENITSKY BM, KOOTSTRA G.

Inhibition of CD18-dependent leukocyte adherence by mAb 6.5 E does not prevent ischemia-reperfusion injury as seen in grafted kidneys.

Transpl Int. 1995; 8(2):126-32.

BROOKE HC

Hairless mice.

J Hered 17: 173-174, 1926.

CHEN C, HANSON SR, LUMSDEN AB.

Boundary layer infusion of heparin prevents thrombosis and reduces neointimal hyperplasia in venous polytetrafluoroethylene grafts without systemic anticoagulation.

J Vasc Surg. 1995; 22(3):237-45; discussion 246-7.

CHING S, THOMA A, MONKMAN S, KELTON JG.

Inhibition of microsurgical thrombosis by the platelet glycoprotein IIb/IIIa antagonist SR121566A.

Plast Reconstr Surg. 2003; 112(1):177-85.

CLOSE P, BICHLER J, KERRY R, EKMAN S, BUELLER HR, KIENAST J, MARBET GA, SCHRAMM W, VERSTRAETE M.

Weak allergenicity of recombinant hirudin CGP 39393 (REVASC) in immunocompetent volunteers. The European Hirudin in Thrombosis Group (HIT Group).

Coron Artery Dis. 1994; 5(11):943-9.

DAVIDSON SF, BRANTLEY SK, TALBOT PJ, DAS SK.

A functional model of microvascular thrombosis.

Plast Reconstr Surg. 1990; 86(3):579-81.

DODDS WJ.

Animal models for the evolution of thrombotic disease.

Ann N Y Acad Sci. 1987; 516:631-5.

ELECTRICWALA A, ATKINSON T.

Effect of hirudin on tissue plasminogen activator induced clot lysis.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1990; 1(3):267-71.

ERIKSSON E, BOYKIN JV, PITTMAN RN

Method for in vivo microscopy of the cutaneous microcirculation of the hairless mouse ear.

Microvasc Res 19: 374-379, 1980.

FAGRELL B, ERIKSSON SE, MALMSTRÖM S, SJÖRLUND A.

Computerized data analysis of capillary blood cell velocity in humans (Abstract).

Int J Microcirc. 1988; 7:S40.

FAREED J, JESKE W, ESCHENFELDER V, IQBAL O, HOPPENSTEADT D, AHSAN A.

Pharmacologic validation of the clinical effects of an optimized low-molecular-weight heparin-reviparin.

Semin Thromb Hemost. 1995; 21(2):212-27.

FERLITO S.

Main antithrombotic drugs in the therapy and prevention of arterial and venous thrombosis]

Minerva Cardioangiol. 1996; 44(6):299-312.

FORTH W, HENSCHLER D.

In: Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie 8. Auflage, S. 568.

Urban & FischerVerlag, Deutschland. 2008.

FRIEDBERG RC, HAGEN PO, PIZZO SV.

The role of endothelium in factor Xa regulation: the effect of plasma proteinase inhibitors and hirudin.

Blood. 1988; 71(5):1321-8.

GLUSA E, MARKWARDT F.

Studies on thrombin-induced endothelium-dependent vascular effects.

Biomed Biochim Acta. 1988; 47(7):623-30.

GRALNICK HR, WILLIAMS S, MCKEOWN LP, HANSMANN K, FENTON JW, KRUTZSCH H.

High-affinity alpha-thrombin binding to platelet glycoprotein Ib alpha: identification of two binding domains.

Proc Natl Acad Sci U S A. 1994; 91(14):6334-8.

GREINACHER A, WARKENTIN TE.

The direct thrombin inhibitor hirudin.

Thromb Haemost. 2008; 99(5):819-29.

GRECO NJ.

Effect of chemical modification of a-thrombin on its reaction with platelets and nucleated cells.

In: BERLINER LJ. Thrombin structure und function.

New York, Plenum Press. 8:126-132. 1992

HAINES ST, BUSSEY HI.

Thrombosis and the pharmacology of antithrombotic agents.

Ann Pharmacother. 1995; 29(9):892-905. Review.

HANSON SR, KOTZE HF, SAVAGE B, HARKER LA.

Platelet interactions with Dacron vascular grafts. A model of acute thrombosis in baboons.

Arteriosclerosis. 1985; 5(6):595-603.

HARENBERG J, JÖRG I, FENYVESI T, PIAZOLO L.

Treatment of patients with a history of heparin-induced thrombocytopenia and anti-lepirudin antibodies with argatroban.

J Thromb Thrombolysis. 2005; 19(1):65-9.

HAYCRAFT JB.

Über die Einwirkung eines Sekretes des officinellen Blutegels auf die Gerinnbarkeit des Blutes.

Arch. Exp. Pathol. Pharmacol. 1884; Bd. 18, S. 209–217.

HEINIGER HJ, BOREY JJ.

In: Handbook of genetically standardized jax mice.

Jackson Laboratories, Bar Harbor, USA. 1980.

HERRMANN KS.

Platelet aggregation induced in the hamster cheek pouch by a photochemical process with excited fluorescein isothiocyanate-dextran.

Microvasc Res. 1983; 26(2):238-49.

HESS F, JERUSALEM C, BRAUN B, GRANDE P.

Evaluation of the patency rate of fibrous microvascular polyurethane prostheses after implantation in the rat aorta.

Microsurgery. 1983; 4(3):178-81.

HIRSCHBERG M, HOFFERBERTH B.

New model of cerebral thrombosis in dogs.

Stroke. 1988; 19(6):741-6.

HIRSH J, O'DONNELL M, EIKELBOOM JW.

Beyond unfractionated heparin and warfarin: current and future advances.

Circulation. 2007; 116(5):552-60.

JOHNSON PC, HEIL BV, PARVA B, HONG C, LABADIE K, BREZNIAK DV, FENTON JW 2ND, GARRETT K.

Thrombin activity on dissected and anastomosed human arteries.

J Surg Res. 1996; 60(1):193-8.

JOHNSON PH.

Hirudin: clinical potential of a thrombin inhibitor.

Annu Rev Med. 1994; 45:165-77.

JOURDAN A, AGUEJOUF O, IMBAULT P, DOUTREMEPUICH F, INAMO J, DOUTREMEPUICH C.

Experimental thrombosis model induced by free radicals. Application to aspirin and other different substances.

Thromb Res. 1995; 79(1):109-23.

JUST M, TRIPIER D, SEIFFGE D.

Antithrombotic effects of recombinant hirudin in different animal models.

Haemostasis. 1991; 21 Suppl 1:80-7.

KARNOVSKY MJ.

A formaldehyde-glutaraldehyde fixative of high osmolality for use in electron microscopy.

J Cell Biol. 1965 27:137-38.

KNOBLOCH K, GOHRITZ A, BUSCH K, SPIES M, VOGT PM.

Hirudo medicinalis-leech applications in plastic and reconstructive microsurgery--a literature review

Handchir Mikrochir Plast Chir. 2007; 39(2):103-7.

KOIKE K, HOLMSEN H.

Requirement for thrombin receptor occupancy during platelet secretion under aggregating and non-aggregating conditions.

Thromb Haemost. 1987; 58(4):1053-9.

KOUZ J, CZECH J, NICOLAY U, DICKNEITE G.

Influence of recombinant hirudin on tissue-factor-induced activation of coagulation in rabbits.

Haemostasis. 1996; 26(4):179-86.

KROLICK MA.

Successful percutaneous coronary intervention using bivalirudin in a patient with chronic lymphocytic leukemia and thrombocytopenia.

Eur J Haematol. 2006; 77(4):355-7.

LAUX V, SEIFFGE D.

Platelet function in the dorsal skin fold chamber of the rat.

In Vivo. 1993; 7(1):45-51.

LEWIS CM, DESCHLER DG.

Desirudin reduces the rate of microvenous thrombosis in a rat model.

Laryngoscope. 2008; 118(7):1149-52.

LINDHOUT T, BLEZER R, HEMKER HC.

The anticoagulant mechanism of action of recombinant hirudin (CGP 39393) in plasma.

Thromb Haemost. 1990; 64(3):464-8.

LIU Q, MIRC D, FU BM.

Mechanical mechanisms of thrombosis in intact bent microvessels of rat mesentery.

J Biomech. 2008; 41(12):2726-34.

MALM K, DAHLBÄCK B, ARNLJOTS B.

Low-molecular-weight heparin (dalteparin) effectively prevents thrombosis in a rat model of deep arterial injury.

Plast Reconstr Surg. 2003; 111(5):1659-66.

MARKWARDT F

Untersuchungen über Hirudin.

Naturwissenschaften. 1955; 42, S. 537-538.

MARKWARDT F

Untersuchungen über Hirudin.

Arch Exp Path Pharmacol. 1956; 228: 229.

MARKWARDT F.

The development of hirudin as an antithrombotic drug.

Thromb Res. 1994; 74(1):1-23.



MAYROVITZ HN, TUMA RF, WIEDEMAN MP.

Leukocyte adherence in arterioles following extravascular tissue trauma.

Microvasc Res. 1980; 20(3):264-74.

MO W, ZHANG YL, CHEN HS, WANG LS, SONG HY.

A novel hirudin derivative characterized with anti-platelet aggregations and thrombin inhibition.

J Thromb Thrombolysis. 2009; 28(2):230-7.

MUELLER-NORDHORN J, WILLICH SN

In: Prävention von Thrombosen und Embolien in der Inneren Medizin

Springer Verlag, Berlin Heidelberg, Deutschland. 2005

MUREEBE L.

Direct thrombin inhibitors: alternatives to heparin.

Vascular. 2007; 15(6):372-5.

PANTELOURIS EM.

Absence of thymus in a mouse mutant.

Nature. 1968; 217: 370-371.

PEDERSON WC.

Clinical use of anticoagulants following free tissue transfer surgery.

J Hand Surg Am. 2008; 33(8):1435-6.

PERRY DD, REDDICK RL, RISCO JM.

Choroidal microvascular repair after argon laser photocoagulation. Ultrastructural observations.

Invest Ophthalmol Vis Sci. 1984; 25(9):1019-26.

PERRY MA, GRANGER DN.

Role of CD11/CD18 in shear rate-dependent leukocyte-endothelial cell interactions in cat mesenteric venules.

J Clin Invest. 1991; 87(5):1798-804.

PIOTROWICZ RS, ORCHEKOWSKI RP, NUGENT DJ, YAMADA KY, KUNICKI TJ.

Glycoprotein Ic-IIa functions as an activation-independent fibronectin receptor on human platelets.

J Cell Biol. 1988; 106(4):1359-64.

PLECHA EJ, SEABROOK GR, BANDYK DF, TOWNE JB.

Determinants of successful peroneal artery bypass.

J Vasc Surg. 1993; 17(1):97-105; discussion 105-6.

PORTER JM, TAYLOR LM JR.

Current status of thrombolytic therapy.

J Vasc Surg. 1985; 2(2):239-49.

PROSKE S, VOLLMAR B, MENDER MD.

Microvascular consequences of thrombosis in small venules: an in vivo microscopic study using a novel model in the ear of the hairless mouse.

Thromb Res. 2000 Jun 15;98(6):491-8.

RODRÍGUEZ VEGAS JM, RUIZ ALONSO ME, TERÁN SAAVEDRA PP.

PGE-1 in replantation and free tissue transfer: early preliminary experience.

Microsurgery. 2007; 27(5):395-7.

ROSENBLUM WI.

Aspects of endothelial malfunction and function in cerebral microvessels.

Lab Invest. 1986; 55(3):252-68.

ROTE WE, WERNS SW, DAVIS JH, FEIGEN LP, KILGORE KS, LUCCHESI BR.

Platelet GPIIb/IIIa receptor inhibition by SC-49992 prevents thrombosis and rethrombosis in the canine carotid artery.

Cardiovasc Res. 1993; 27(3):500-7.

RUBENS FD, WEITZ JI, BRASH JL, KINLOUGH-RATHBONE RL.

The effect of antithrombin III-independent thrombin inhibitors and heparin on fibrin accretion onto fibrin-coated polyethylene.

Thromb Haemost. 1993; 69(2):130-4.

SANIABADI AR, UMEMURA K, MATSUMOTO N, SAKUMA S, NAKASHIMA M.

Vessel wall injury and arterial thrombosis induced by a photochemical reaction.

Thromb Haemost. 1995; 73(5):868-72.

SATO M, OHSHIMA N.

Effect of wall shear rate on thrombogenesis in microvessels of the rat mesentery.

Circ Res. 1990; 66(4):941-9.

SCHROER K.

Antiplatelet drugs. A comparative review.

Drugs. 1995; 50(1):7-28.

SEIFFGE D, KREMER E.

Influence of ADP, blood flow velocity, and vessel diameter on the laser-induced thrombus formation.

Thromb Res. 1986; 42(3):331-41.

SERAFIN D, RIOS AV, GEORGIADIS N.

Fourteen free groin flap transfers.

Plast Reconstr Surg. 1976; 57(6):707-15.

SIEGEL JM, MARKOU CP, KU DN, HANSON SR.

A scaling law for wall shear rate through an arterial stenosis.

J Biomech Eng. 1994; 116(4):446-51.

SHEFFIELD WP, ELTRINGHAM-SMITH LJ, GATAIANE S, BHAKTA V.

A long-lasting, plasmin-activatable thrombin inhibitor aids clot lysis in vitro and does not promote bleeding in vivo.

Thromb Haemost. 2009; 101(5):867-77.

SHEN GX.

Inhibition of thrombin: relevance to anti-thrombosis strategy.

Front Biosci. 2006; 11:113-20.

SPEIDL WS, HÖCHTL T, WOJTA J, HUBER K

Bivalirudin – From the bench into the cathlab.

Austrian Journal of Cardiology 2006; 13 (5-6), 154-159.

STEPNICK DW, HAYDEN RE, HOGIKYAN ND.

Development of thrombosis models in the rabbit.

Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1994; 120(9):997-1002.

STURZENEGGER M, BÜCHLER U.

Acute vascular disorder as a complication of replantation and revascularization of the digital area

Handchir Mikrochir Plast Chir. 1990; 22(1):39-45.

SUGIDACHI A, ASAI F, TANI Y, HOSOKAWA T, KOIKE H.

Occlusive thrombosis in the femoral artery of the rabbit: a pharmacological model for evaluating antiplatelet and anticoagulant agents.

Blood Coagul Fibrinolysis. 1996; 7(1):57-64.

SPYROPOULOS AC.

Brave new world: the current and future use of novel anticoagulants.

Thromb Res. 2008; 123 Suppl 1:S29-35.

TEN CATE H, NURMOHAMED MT, TEN CATE JW.

Developments in antithrombotic therapy: state of the art anno 1996.

Pharm World Sci. 1996; 18(6):195-203.

UMEMURA K, KOHNO Y, MATSUNO H, UEMATSU T, NAKASHIMA M.

A new model for photochemically induced thrombosis in the inner ear microcirculation and the use of hearing loss as a measure for microcirculatory disorders.

Eur Arch Otorhinolaryngol. 1990; 248(2):105-8.

VAN DER GIESSEN WJ, MOOI W, RUTTEMAN AM, VAN VLIET HH, SLAGER CJ, VERDOUW PD.

A new model for coronary thrombosis in the pig: preliminary results with thrombolysis.

Eur Heart J. 1983; 4 Suppl C:69-76.

VERSTRAETE M, NURMOHAMED M, KIENAST J, SIEBECK M, SILLING-ENGELHARDT G, BÜLLER H, HOET B, BICHLER J, CLOSE P.

Biologic effects of recombinant hirudin (CGP 39393) in human volunteers. European Hirudin in Thrombosis Group.

J Am Coll Cardiol. 1993; 22(4):1080-8.

WALLIS RB.

Hirudins: from leeches to man.

Semin Thromb Hemost. 1996; 22(2):185-96.

WEICHERT W, PAULIKS V, BREDDIN HK.

Laser-induced thrombi in rat mesenteric vessels and antithrombotic drugs.

Haemostasis. 1983; 13(1):61-71.

JACOBI Y.

Über Hirudin.

Dtsch Med Wschr. 1904; 30: 1786-7.

YAO SK, AKHTAR S, SCOTT-BURDEN T, OBER JC, GOLINO P, BUJA LM, CASSCELLS W, WILLERSON JT.

Endogenous and exogenous nitric oxide protect against intracoronary thrombosis and reocclusion after thrombolysis.

Circulation. 1995; 15;92(4):1005-10.

YOKOTA K, YAMASHITA A, ODA M.

Anti-thrombotic activity of KBT-3022 in experimental models of thrombosis.

Jpn J Pharmacol. 1995 Jun;68(2):201-6.

ZEINTL H, KLYSCZ T, JÜNGER M, JUNG F.

Cap image--a new kind of computer-assisted video image analysis system for dynamic capillary microscopy

Biomed Tech (Berl). 1997; 42(6):168-75.

## **Danksagung**

Herrn Prof. Dr. med. Michael D. Menger danke ich für die Überlassung der Dissertationsarbeit sowie für die freundliche Aufnahme am Institut für Klinisch – Experimentelle Chirurgie in Homburg/Saar. Nicht zuletzt aufgrund seiner vertrauensvollen Förderung bot sich mir die Gelegenheit diese Arbeit eigenverantwortlich durchzuführen und Teilaspekte auf verschiedenen nationalen und internationalen Kongressen vorzustellen und die Arbeit in anerkannten medizinischen Fachjournalen zu publizieren. Ganz besonders möchte ich mich bedanken für seine, weit über den Rahmen dieser Dissertation hinausgehende Unterstützung, die maßgeblich meinen bisherigen beruflichen Werdegang mit beeinflusst hat.

Mein besonderer Dank gilt Ihm nicht zuletzt auch deswegen, weil er mir, was sicher nicht immer einfach war, ein solides wissenschaftliches Rüstzeug mitgegeben und meinen Sinn für medizinische Sachverhalte geschärft hat.

Herrn Prof. Dr. med. Eberhard Morgenstern und seinem Team möchte ich danken für die stets freundschaftliche Betreuung und hilfreiche Unterstützung bei der Bearbeitung des Themas, ohne die diese Arbeit in der vorliegenden Form nicht möglich gewesen wäre.

Herrn Dr. med. Dirk Seiffge gilt mein Dank für die freundliche Überlassung des in der Studie eingesetzten rekombinanten Hirudin und seine stets hilfsbereite Unterstützung.

Zuletzt möchte ich mich noch bedanken beim gesamten Mikrozirkulationsteam des Instituts für Klinisch – Experimentelle Chirurgie, bei allen technischen Assistentinnen sowie insbesondere bei meinen Kollegen die mich durch das unter uns herrschende freundschaftliche Klima die Tage und Nächte im Institut (und nicht nur dort) in angenehmer Erinnerung behalten lassen.



## Publikationen

### Originalarbeiten und Buchbeiträge

1. **F. Roesken**, E. Uhl, M.D. Menger, S.B. Curri, K. Meßmer.  
Gewebeprotektion bei akuter Ischämie durch transdermale Wirkstoffapplikation über Liposomen.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 93, 477-480 (1993)
2. **F. Roesken**, E. Uhl, M.D. Menger, S.B. Curri, K. Meßmer.  
Transdermale Applikation einer vasoaktiven Substanz über Liposomen zur Verbesserung der Wundheilung.  
  
In: R. Rahmanzadeh, E.E. Scheller, Hrsg. Alloplastische Verfahren und Mikrochirurgische Maßnahmen. Einhorn - Presse Verlag, Reinbek, 429 - 431 (1994)
3. D. Nolte, P. Schmid, U. Jäger, A. Botzlar, **F. Roesken**, R. Hecht, E. Uhl, K. Messmer, D. Vestweber.  
Leukocyte Rolling in Non - Inflamed Venules of Murine Striated Muscle and Skin is Mediated by P - Selectin, But Not by L - Selectin.  
  
Am. J. Physiol. 36: 1637 - 1643 (1994)
4. **F. Roesken**, E. Uhl, A. Sirsjö, K. Meßmer.  
Akzeleration der Wundheilung durch Platelet Derived Growth Factor bei lokaler Ischämie und Diabetes mellitus.  
  
In: H. Rudolph, Hrsg. Plastische und Wiederherstellungschirurgie: Qualitätssicherung - Komplikationen -Innovationen. Einhorn - Presse Verlag, Reinbek, 434 - 436 (1997)

5. E. Uhl, **F. Roesken**, K. Meßmer.  
Transdermale Applikation von Platelet Derived Growth Factor zur Verbesserung der Wundheilung bei lokaler Ischämie und Diabetes mellitus.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 97, 705-708 (1997)
6. M. Koschnick, **F. Roesken**, H. Räkers, I. Siebenschuh, M.D. Menger, W. Mutschler.  
Ein neues Modell zur quantitativen Analyse der Wundheilung von Defektwunden.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 97, 511-514 (1997)
7. M. Rücker, **F. Roesken**, B. Vollmar, M.D. Menger.  
Ein neues Modell zur in vivo Analyse der Mikrozirkulation osteomyokutaner Lappen.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 97, 515-517 (1997)
8. **F. Roesken**, M. Rücker, I. Bauer, M. Amon, M. Bauer, M.D. Menger.  
Hitzeschock-Priming reduziert das mikrovaskuläre Perfusionsversagen kritisch perfundierter Hautlappen - Ein möglicher Mechanismus der Gewebeprotektion bei akuter Ischämie.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 97, 527-530 (1997)
9. **F. Roesken**, M. Rücker, M. Amon, D. Kubulus, I. Bauer, M. Bauer, M.D. Menger.  
Ischemic preconditioning induced tissue protection of endangered skin flaps is mediated by heat shock protein 32.  
  
Proceedings for the 52<sup>nd</sup> Sessions of the Owen H. Wangensteen Surgical Forum, 678-681 (1997)
10. **F. Roesken**, M. Ruecker, B. Vollmar, M.D. Menger.  
A new model for in vivo analysis of thrombus formation and vascular recanalisation.  
  
Thromb. Haemost. 78: 1408 - 1414 (1997)

11. I. Siebenschuh, **F. Roesken**, M. Koschnick, H. Räkers, W. Mutschler, M.D. Menger.  
Induktion von Granulationsgewebe und Epithel an Defektwunden durch lokale  
Behandlung mit Hyaluronsäure.  
  
In: H. Rudolph, Hrsg. Innovationen in der Plastischen Chirurgie. Einhorn - Presse Verlag,  
Reinbek, 277 - 279 (1998)
12. M. Amon, **F. Roesken**, D. Kubulus, I. Bauer, M. Bauer, M.D. Menger.  
Einfluß der Hitzeschockproteine 32 und 70 auf die Entstehung von Nekrosen  
ischämischer Hautlappen.  
  
In: H. Rudolph, Hrsg. Innovationen in der Plastischen Chirurgie. Einhorn - Presse Verlag,  
Reinbek, 277 - 279 (1998)
13. M. Rücker, O. Strobel, B. Vollmar, **F. Roesken**, M.D. Menger.  
Bedeutung der Flowmotion für gefäßgestielte Mehrgewebelappen unter kritischen  
Perfusionsbedingungen.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 249-250 (1998)
14. T. Schäfer, M. Rücker, **F. Roesken**, M. Bauer, M.D. Menger.  
Reduktion der inflammatorischen Antwort nach Lappentransfer durch lokale  
Hitzeschockvorbehandlung.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 203-204 (1998)
15. M. Koschnick, **F. Roesken**, J. Keller, R. Hanselmann, B. Koch, W. Mutschler.  
Quantitative Bestimmung der Zellzusammensetzung von humanem Granulationsgewebe  
durch Fluoreszenz Aktiviertes Cell Sorting (FACS).  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 43-44 (1998)

16. I. Siebenschuh, **F. Roesken**, M. Koschnick, H. Räkers, W. Mutschler, M.D. Menger.  
Lokale Applikation von Hyaluronsäure zur Verbesserung der Wundheilung bei Diabetes.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 467-468 (1998)
17. B. Mayer, **F. Roesken**, A. Lepper, G. Wanner, M.D. Menger.  
rG-CSF beschleunigt die Geweberegeneration bei Neutropenie - bedingter  
Wundheilungsstörung. Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 469-470 (1998)
18. M.D. Menger, **F. Roesken**, M. Rücker , D. Seiffge , B. Vollmar.  
Antithrombotische und thrombolytische Wirksamkeit von rHirudin in Mikrogefäßen.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 19-20 (1998)
19. **F. Roesken**, D. Kubulus , M. Amon , M. Rücker , I. Bauer, M.D. Menger.  
Gewebeprotektion durch Ischämische Präkonditionierung beruht maßgeblich auf der  
Expression von Hitzeschockprotein 32.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 98, 251-253 (1998)
20. E. Uhl, **F. Roesken**, S.B. Curri, M.D. Menger, K. Messmer.  
Tissue protection after acute ischemia by transdermal drug application via liposomes.  
  
Plast. Reconstr. Surg. 102: 1598-1602 (1998)
21. M. Ruecker, **F. Roesken**, B. Vollmar, M.D. Menger.  
A novel approach for comparative study of periost, muscle, subcutis and skin  
microcirculation by intravital fluorescence microscopy.  
  
Microvasc. Res. 56: 30 - 42 (1998)

22. **F. Roesken**, M. Ruecker, B. Vollmar, M.D. Menger.  
In vivo analysis of antithrombotic effectiveness of recombinant hirudin on microvascular thrombus formation and recanalization.  
  
J. Vasc. Surg. 23: 498 - 505 (1998)
23. I. Siebenschuh, **F. Roesken**, M. Koschnick, M.D. Menger, W. Mutschler.  
Hyaluronsäure in der Wundbehandlung. Wirkprinzipien und Stand der Therapie.  
  
Zentralbl. Wund. 8: 12 - 14 (1998)
24. M. Koschnick, F. Busser, **F. Roesken**, R.G. Hanselmann, B. Koch, M.D. Menger, W. Mutschler.  
Die Expression des Hyaluronsäurerezeptors CD44 und spezifischer Fibronectinrezeptoren in humanem Granulationsgewebe chronischer Wunden.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 99, 467 - 468 (1999)
25. B. Mayer, **F. Roesken**, A. Lepper, G. Wanner, M.D. Menger.  
G-CSF beschleunigt die Wundheilung bei diabetischer Stoffwechsellage.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 99, 46 - 48 (1999)
26. **F. Roesken**, M. Koschnick, B. Mayer, M.D. Menger, N. Pallua.  
Der Verlust des Suppressorgens p53 führt zu einer verzögerten Wundheilung.  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 99, 89 - 91 (1999)
27. **F.Z. Dagtekin, F. Roesken**.  
Insellappen nach Littler und Oberlin.  
  
In: W. Stock, Hrsg. Kursband der Münchener Lappenkurse 99, 32 - 36 (1999)

28. **F. Roesken, F.Z. Dagtekin.**  
Lappenplastik nach Hilgenfeldt und Foucher.  
  
In: W. Stock, Hrsg. Kursband der Münchener Lappenkurse 99, 23 - 26 (1999)
29. W. Mutschler, **F. Roesken.**  
Problematik der Chronischen Wunde.  
  
In: B. Steckmeier, Hrsg. Suppl. 99 – Münchner Gefäßtage. Media Verlag, München, 67 - 72 (1999)
30. M. Rücker, **F. Roesken**, T. Schafer, W.J. Spitzer, B. Vollmar, M.D. Menger.  
In vivo analysis of the microcirculation of osteomyocutaneous flaps using fluorescence microscopy.  
  
Br. J. Plast. Surg. 52: 644 – 652 (1999)
31. M. Rücker, O. Strobel, B. Vollmar, **F. Roesken**, M.D. Menger.  
Vasomotion in critically perfused muscle protects adjacent tissues from capillary perfusion failure.  
  
Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 279: 550 –558 (2000)
32. **F. Roesken**, E. Uhl, S.B. Curri, M.D. Menger, K. Messmer.  
Acceleration of wound healing by topical drug delivery via liposomes.  
  
Langenbecks. Arch. Surg. 385: 42 – 49 (2000)
33. A. Pfadenhauer, **F. Roesken**, S. Deiler, W. Mutschler, W. Stock.  
Vakuumversiegelung zur Konditionierung kritischer Wunden.  
  
Zentralbl. Wund. 13: 13 - 14 (2000)

34. A. Pfadenhauer, W. Stock, W. Mutschler, **F. Roesken**.  
Vakuumversiegelung zur Behandlung kritischer Wunden.  
  
Med. Praxis 4: 27 – 30 (2000)
35. M. Rücker, T. Schafer, **F. Roesken**, W.J. Spitzer, M. Bauer, M.D. Menger.  
Local heat-shock priming-induced improvement in microvascular perfusion in  
osteomyocutaneous flaps is mediated by heat-shock protein 32.  
  
Br. J. Surg. 88: 450 – 457 (2001)
36. M. Rücker, T. Schafer, **F. Roesken**, W.J. Spitzer, M. Bauer, M.D. Menger.  
Reduction of inflammatory response in composite flap transfer by local stress  
conditioning-induced heat-shock protein 32.  
  
Surgery 129: 292 – 301 (2001)
37. **F. Roesken**.  
Pathophysiologie der chronischen Wunde.  
  
Facharzt Suppl 1: 13-15 (2001)
38. W. Mutschler, C.M. Muth, **F. Roesken**.  
Stellenwert der hyperbaren Sauerstofftherapie bei chronischen Wunden.  
  
Trauma Berufskrankh. 3: 267 – 271 (2001)
39. M. Rücker, B. Vollmar, **F. Roesken**, W.J. Spitzer, M.D. Menger.  
Microvascular transfer-related abrogation of capillary flow motion in critically reperfused  
composite flaps.  
  
Br. J. Plast. Surg. 55:129-35 (2002)

40. O. Safak, N. Dagdelen, C. Volkering, A. Pfadenhauer, A. Botzlar, C.P. Sommerhoff, H.W. Krell, W. Mutschler, **F. Roesken**.  
Enhancement of impaired wound healing in an animal model by local inhibition of matrix metalloproteinase activity  
  
Langenbecks Arch. Chir. Suppl. Chir. Forum 03, 21- 24 (2003)
41. D. Kubulus, **F. Roesken**, M. Amon, M. Bauer, I. Bauer, M.D. Menger.  
Mechanism of the delay phenomenon: tissue protection is mediated by heme oxygenase-1.  
  
Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2004 Nov;287(5):H2332-40. Epub 2004 Jun 24.PMID: 15217802
42. Kubulus D, **Roesken F**, Amon M, Rücker M, Bauer M, Bauer I, Menger MD.  
Experimental cooling-induced preconditioning attenuates skin flap failure.  
  
Br J Surg. 2005 Nov;92(11):1432-8.PMID: 16184623



## Preise

1. **F. Roesken**, D. Kubulus, M. Amon, M. Rücker, I. Bauer, M. Bauer, M.D. Menger.  
Reduction of ischemia-induced perfusion failure by stress conditioning.  
  
Young Investigator Award der deutschen Gesellschaft für Mikrozirkulation. 1997
2. I. Siebenschuh, M. Koschnick, H. Räkers, **F. Roesken**.  
Topische Hyaluronsäurebehandlung chronischer Wunden bei Diabetes.  
  
Vortragspreis der Deutschen Gesellschaft für Wundbehandlung. 1998
3. F. Busser, **F. Roesken**, R. Hanselmann, M. Koschnick.  
FACS - Analyse des zellulären Verteilungsmusters im Granulationsgewebe.  
  
Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Wundbehandlung. 1998
4. F. Busser, M. Koschnick, M.D. Menger, **F. Roesken**, R. Hanselmann.  
Der Hyaluronsäurerezeptorstatus im Granulationsgewebe.  
  
Posterpreis der Deutschen Gesellschaft für Wundbehandlung. 1999
5. **F. Roesken**, N. Dagdelen, O. Safak, C. Volkering, A. Botzlar, A. Pfadenhauer, H.W. Krell,  
C. P. Sommerhoff, W. Mutschler.  
Lokale Hemmung der Proteasenaktivität zur Verbesserung der Gewebereparation bei  
verzögerter Wundheilung.  
  
Vortragspreis der Vereinigung der Deutschen Plastischen Chirurgen. 2002

## Patente

1. **F. Roesken**, C. Sommerhoff, N. Dagdelen, O. Safak.  
Patent für "Use of a trioxypyrimidine for the treatment of chronic wounds".  
Nationale und internationale Patentierung 06/03 (ausgelaufen)

## **Lebenslauf**

### **Persönliche Daten**

geboren am	11. Oktober 1966 in Augsburg
Eltern	Wolfgang Rösken, selbstständig Karin Rösken, geb. Opitz, Einzelhandelskauffrau
Familienstand	geschieden
Nationalität	deutsch
Konfession	katholisch

### **Ausbildung**

1974 - 78	Grundschule an der Morellstraße, Augsburg
1978 - 87	Gymnasium bei St. Stephan, Augsburg
1987	Allgemeine Hochschulreife

### **Studium**

1988 - 95	Medizinische Fakultät der Ludwig - Maximilians Universität München  Tulane Medical School  New Orleans, Louisiana, USA
1995	3. Staatsexamen

## **Beruflicher Werdegang**

1995 - 1997	Arzt im Praktikum/Wissenschaftlicher Assistent am Institut für Klinisch - Experimentelle Chirurgie der Universität des Saarlandes, Homburg/Saar (Direktor: Prof. Dr. M.D. Menger)
1998 - 1999	Assistenzarzt an der Klinik für Verbrennungs- und Plastische Wiederherstellungschirurgie, RWTH Aachen, Aachen (Direktor: Prof. Dr. Dr. N. Pallua)
1999 - 2001	Assistenzarzt an der Chirurgischen Klinik des Universitätsklinikums Innenstadt, LMU München, München (Direktor: Prof. Dr. W. Mutschler)
2001 - 2002	Funktionsoberarzt an der Klinik für Plastische und Handchirurgie, Klinikum der Univ. Witten/Herdecke, Wuppertal (Direktor: Prof. Dr. Giulio Ingianni)
2002	Facharzt für Plastische Chirurgie
2003	Facharzt an der Abteilung für Plastische Chirurgie und Handchirurgie, St. Agatha Krankenhaus, Köln (Leitender Arzt: Dr. S. Eren / Dr. R. Krein)
seit 2004	Niederlassung als Facharzt für Plastische Chirurgie

## **Mitgliedschaften**

seit 1997	Deutsche Gesellschaft für Mikrozirkulation e. V.
seit 1999	Deutsche Gesellschaft der Plastischen, Rekonstruktiven und Ästhetischen Chirurgen